



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020007823-9 A2



* B R 1 1 2 0 2 0 0 7 8 2 3 A 2 *

(22) Data do Depósito: 19/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

(54) Título: SISTEMAS E MÉTODOS PARA PRODUZIR CÉLULAS B GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA EXPRESSAR ANTICORPOS SELECIONADOS

(51) Int. Cl.: C12N 5/078; C12N 5/0781; C12N 15/90.

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2017 US 62/580,303; 20/10/2017 US 62/575,275; 29/01/2018 US 62/623,371.

(71) Depositante(es): FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER.

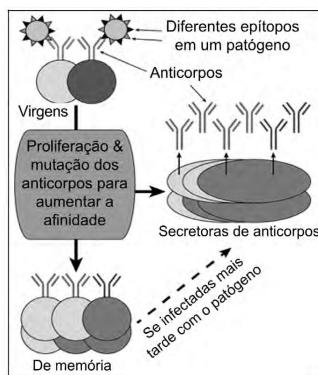
(72) Inventor(es): JUSTIN J. TAYLOR; HOWELL F. MOFFETT.

(86) Pedido PCT: PCT US2018056789 de 19/10/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/079772 de 25/04/2019

(85) Data da Fase Nacional: 20/04/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a sistemas e métodos para modificar geneticamente células B para que expressem anticorpos selecionados. Os sistemas e métodos podem ser usados para: eliminar a necessidade de vacinações clássicas; oferecer proteção contra agentes infecciosos contra os quais ainda não há vacinas disponíveis; oferecer proteção contra agentes infecciosos quando os pacientes tiverem a imunidade suprimida por algum outro motivo; e/ou prover um benefício oferecido por um anticorpo terapêutico, tal como no tratamento de transtornos autoimunes.



"SISTEMAS E MÉTODOS PARA PRODUZIR CÉLULAS B GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA EXPRESSAR ANTICORPOS SELECIONADOS"

REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001]O presente pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório dos EUA nº 62/575.275, depositado no dia 20 de outubro de 2017, ao Pedido de Patente Provisório dos EUA nº 62/580.303, depositado no dia 1º de novembro de 2017, e ao Pedido de Patente Provisório dos EUA nº 62/623.371, depositado no dia 29 de janeiro de 2018, cada um dos quais incorpora-se ao presente documento por referência na íntegra como se tivesse sido aqui estabelecido por inteiro.

DECLARAÇÃO SOBRE A LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002]A Listagem de Sequências associada a este pedido é submetida em formato de arquivo de texto em vez de em uma cópia em papel e incorpora-se ao presente relatório descritivo por referência. O nome do arquivo de texto que contém a Listagem de Sequências é 18-024-WO-PCT_ST25.txt. O arquivo de texto tem 184 KB, foi criado no dia 19 de outubro de 2018 e está sendo enviado eletronicamente via EFS-Web.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003]A presente revelação propõe sistemas e métodos para modificar geneticamente células B para que expressem anticorpos selecionados. Os sistemas e métodos podem ser usados para: eliminar a necessidade de vacinações clássicas; oferecer proteção contra agentes infecciosos contra os quais ainda não há vacinas disponíveis; oferecer proteção contra agentes infecciosos quando os pacientes tiverem a imunidade suprimida por algum outro motivo; e/ou prover um benefício oferecido por um anticorpo terapêutico, tal como no tratamento de transtornos autoimunes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004]As vacinas são desenvolvidas para aumentar a imunidade de um paciente contra uma infecção específica ao estimular as células B para que produzam anticorpos contra o agente infeccioso almejado. A vacinação pediátrica rotineira é uma intervenção clínica consagrada com risco comparativamente baixo e alta eficácia. Contudo, infelizmente, não há vacinas disponíveis contra todos os agentes infecciosos. Por exemplo, todos os anos nos Estados Unidos, milhões de crianças consultam um médico ou dão entrada no pronto-socorro por causa de infecções pelo Vírus Sincicial Respiratório (RSV).

[005]Há décadas, pesquisadores vêm tentando desenvolver uma vacina capaz de induzir as células B a produzir anticorpos que sejam eficazes contra vírus tais como o RSV, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o Zika vírus. Porém, todos os esforços para induzir à produção de anticorpos protetores fracassaram. A única vacina contra o RSV amplamente testada na verdade só piorou a infecção: os anticorpos gerados após a vacinação não desativaram o vírus, mas, em vez disso, ampliaram sua capacidade de infectar células. Além do RSV, HIV e Zika vírus, há vários outros agentes infecciosos contra os quais não há vacinas eficazes à disposição.

[006]Além de combater infecções, os anticorpos também podem ser úteis como tratamento contra outras condições, tais como doenças autoimunes. No entanto, essas terapias à base de anticorpos geralmente requerem repetidas injeções de anticorpos para manter a proteção.

[007]Também é digno de nota que vários pacientes são submetidos a transplantes de células-tronco da medula óssea ou de células-tronco hematopoiéticas como tratamento contra malignidades hematológicas (por exemplo, leucemia, linfoma, mieloma). Já outros pacientes recebem infusões de células-tronco hematopoiéticas geneticamente modificadas que oferecem um gene terapêutico de

que o paciente carece. Todos esses tratamentos requerem que o sistema imunológico subjacente do paciente seja suprimido antes da administração do transplante ou de células-tronco hematopoiéticas geneticamente modificadas, deixando uma janela de supressão imunológica perigosa antes de o sistema imunológico do paciente repovoar-se após o tratamento. Durante esse período de supressão imunológica, os pacientes são extraordinariamente suscetíveis a infecções, tais como por RSV, influenza, parainfluenza e metapneumovírus (MPV). Essas infecções são um fator de alto risco e estão associadas a inúmeros óbitos em seguida a esses tratamentos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008]A presente revelação propõe sistemas e métodos para modificar geneticamente células B para que expressem anticorpos selecionados. Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados reduzem ou eliminam a necessidade de vacinações existentes. Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados protegem contra a infecção por vírus para os quais ainda não há nenhuma estratégia de vacinação eficaz à disposição (por exemplo, RSV, HIV, Zika). Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados reduzem ou eliminam a necessidade de injeção de anticorpos terapêuticos, tais como os administrados para tratar vários transtornos autoimunes. Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados protegem pacientes com supressão imunológica contra infecções. Em algumas modalidades, os métodos da invenção podem ser usados para reprogramar células B para proteção contra centenas de diferentes agentes infecciosos ou patógenos, tudo isso através de uma única manipulação de laboratório que leva alguns dias.

[009]Em modalidades específicas, a presente invenção propõe esses benefícios através da introdução direcionada de um constructo genético em uma área específica do genoma endógeno das células B. Relevantemente, a modificação

genética das células B é complicada por causa da alta variabilidade das sequências genéticas que é necessária dentro dessas células para a diversidade dos anticorpos. Esse alto grau de variabilidade genética faz com que mirar diretamente regiões codificantes de anticorpo para manipulação genética seja impraticável. Além disso, a remoção e substituição de porções codificantes do genoma das células B também não são eficazes porque essa abordagem afeta negativamente a função das mesmas.

[010]Outros desafios para modificar geneticamente células B para que expressem anticorpos selecionados acontecem porque os anticorpos são compostos por unidades proteicas distintas, chamadas de cadeias pesadas e cadeias leves. As diferentes cadeias são codificadas por diferentes porções do genoma das células B, mas ainda assim devem unir-se para formar um anticorpo funcional.

[011]A presente invenção supera os desafios mencionados, dentre outros, ao identificar uma região constante no genoma das células B que pode ser mirada com confiança para a introdução genética e que, quando modificada, resulta na expressão preferencial de um constructo genético introduzido em comparação a porções correspondentes no genoma natural das células B. Essa estratégica supera a variabilidade das sequências associada ao genoma das células B e também supera a necessidade de remover e substituir porções do genoma endógeno das células B para obter a expressão funcional do anticorpo selecionado. A superação da necessidade de remover e substituir porções do genoma endógeno das células B preserva a função das células B após a manipulação genética.

[012]Em modalidades específicas, a área mencionada almejada para introdução genética é uma região intrônica a montante ou a jusante de um elemento intensificador E μ da SEQ ID N°: 85 (humana) ou SEQ ID N°: 86 (murídea). Em modalidades específicas, a área almejada para introdução genética é uma região intrônica constante da SEQ ID N°: 1 ou 2 (humana) ou SEQ ID N°: 3 ou 4 (murídea).

Em modalidades específicas, as sequências de DNA humano dentro da SEQ ID Nº: 1 que serão miradas para a introdução genética incluem as SEQ ID Nº: 5-24. Em algumas modalidades, as sequências de DNA humano dentro da SEQ ID Nº: 2 que serão miradas para a introdução genética incluem as SEQ ID Nº: 25-44. Em modalidades específicas, as sequências de DNA murídeo dentro da SEQ ID Nº: 3 que serão miradas para a introdução genética incluem as SEQ ID Nº: 45-64. Em modalidades específicas, as sequências de DNA murídeo dentro da SEQ ID Nº: 4 que serão miradas para a introdução genética incluem as SEQ ID Nº: 65-84. Sequências genéticas particularmente capazes de mirar esses sítios para modificação genética são descritas na presente revelação como RNA guia (gRNA) de SEQ ID Nº: 87-89 e 290-366.

[013]Em modalidades específicas, o posicionamento e os componentes de um constructo genético introduzido resultam na expressão preferencial do constructo genético introduzido em detrimento das porções correspondentes do genoma endógeno das células B. Essas modalidades também incluem elementos que superam desafios associados a porções de anticorpos sendo codificadas por diferentes regiões do genoma endógeno das células B.

[014]Em modalidades específicas, os constructos genéticos são introduzidos em uma dentre as SEQ ID Nº: 1, 2, 3 e 4 e incluem (i) um promotor; (ii) um peptídeo de sinal; (iii) um transgene que codifica toda uma cadeia leve de um anticorpo selecionado; (iv) um ligante flexível ou um elemento saltador; (v) a porção variável da cadeia pesada de um anticorpo selecionado; e (vi) uma junção de *splice* que resulta na expressão da região constante da cadeia pesada endógena da célula B. Nessas modalidades, a expressão do anticorpo selecionado como um único constructo supera os desafios associados a porções de anticorpos sendo codificadas por diferentes regiões do genoma endógeno de células B. A inclusão de um ligante flexível liga fisicamente a porção de cadeia leve e a porção de cadeia

pesada do anticorpo selecionado expresso de uma maneira tal que permite que elas formem uma unidade funcional e, ao mesmo tempo, reduz o risco de as porções de anticorpo se ligarem a outras cadeias de anticorpo potencialmente expressas a partir do genoma endógeno da célula B. O uso de um elemento saltador não interliga fisicamente a porção de cadeia leve e a porção de cadeia pesada, mas sua expressão em íntima proximidade também resulta em associação para formar uma unidade funcional ao passo que, ao mesmo tempo, reduz o risco de as porções de anticorpo se ligarem a outras cadeias de anticorpo potencialmente expressas a partir do genoma endógeno da célula B. A inclusão de uma junção de *splice* resulta no anticorpo selecionado incluindo uma região constante de cadeia pesada apropriada para a ativação atual e/ou estado de maturação da célula B. Em outras palavras, os anticorpos expressos selecionados podem ser expressos com qualquer uma das regiões constantes de cadeia pesada endógenas da célula B, e a região constante da cadeia pesada expressa com o anticorpo selecionado naturalmente pode mudar com o tempo.

[015]A presente invenção também propõe métodos para garantir que só células B que tenham sido geneticamente modificadas com eficácia para expressar um anticorpo selecionado sejam coletadas para formulação e administração a pacientes. Por exemplo, antes da modificação genética, uma célula B expressará naturalmente anticorpos que incluem ou uma cadeia leve kappa ou uma cadeia leve lambda. A célula B pode ser modificada para expressar uma cadeia leve diferente da cadeia kappa ou lambda que ela expressa naturalmente, e somente as células B que expressam a cadeia substituída são selecionadas para formulação e administração.

[016]A presente invenção também propõe várias outras estratégias para modificar com eficácia células B para que proporcionem os benefícios descritos neste documento. Essas e outras estratégias são descritas mais plenamente na Descrição Detalhada abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[017]FIG. 1. Representação esquemática da resposta de células B a estratégias de vacinação clássicas.

[018]FIGs. 2A a 2C. Representações esquemáticas de estratégias de vacinação da técnica anterior contra o Vírus Sincicial Respiratório (RSV): (FIG. 2A) vacina de RSV inativado com formalina; (FIG. 2B) vacinas de RSV “aprimoradas”; e (FIG. 2C) vacina de arcabouço de epítopo do RSV.

[019]FIGs. 3A a 3C. Síntese de tentativas anteriores para contornar a vacinação e prover diretamente anticorpos protetores contra o RSV: (FIG. 3A) injeção de palivizumabe; (FIG. 3B) expressão de palivizumabe mediada por adenovírus; e (FIG. 3C) modificação e diferenciação genética de células-tronco.

[020]FIGs. 4A e 4B. Representações esquemáticas de modalidades específicas para estratégias de proteção reveladas neste documento: (FIG. 4A) modificação de células B para proteger contra o RSV; e (FIG. 4B) estratégia para proteção simultânea.

[021]FIG. 5. Secreção hipotética de palivizumabe por subtipos de células B na presença e ausência de infecção.

[022]FIGs. 6A, 6BA. As estruturas de (FIG. 6A) genes de anticorpo e (FIG. 6B) proteínas de anticorpo, destacando-se um desafio técnico da invenção: de que anticorpos são proteínas compostas por dois produtos gênicos distintos. Em modalidades específicas, constructos genéticos sintéticos que codificam anticorpos selecionados revelados neste documento utilizam elementos saltadores (por exemplo, peptídeos auto-clivantes) para superar desse desafio.

[023]FIG. 7. Representação esquemática de um lócus do gene de cadeia pesada endógeno que inclui segmentos V, D e J que recombina-se, elementos intensificadores, representados por um círculo e um ovoide, e 6 possíveis regiões constantes que podem ser expressas. As células B começam expressando as

regiões constantes μ/δ , mas podem passar a usar as regiões constantes γ , α ou ϵ ao excluir o DNA interveniente. Note-se também que cada segmento V é associado a um promotor de cadeia pesada indicado por uma seta que leva à expressão da cadeia pesada após a recombinação.

[024]FIGs. 8A e 8B. Visto que duas proteínas unem-se para formar um anticorpo, pode ser desejável mirar ou inativar a cadeia pesada de anticorpo (IgH) endógena e/ou a cadeia leve de anticorpo (IgL) endógena da célula B. Na ausência desse direcionamento ou inativação, anticorpos híbridos indesejados poderiam se formar (isto é, poderia ocorrer o pareamento de uma cadeia leve endógena com uma cadeia pesada do anticorpo selecionado ou vice-versa). (FIG. 8A) Uma abordagem para mirar a IgH endógena e uma quimera resultante que incluiria porções do anticorpo selecionado (por exemplo, palivizumabe). (FIG. 8B) Uma abordagem para inativação da IgL. Nas abordagens representadas, um códon de parada pode ser posicionado a montante do constructo genético introduzido (ou como parte do mesmo).

[025]FIG. 9. Representação esquemática ilustrando as interações de intensificadores de cadeia pesada com (topo) um VDJ endógeno ou (base) um VDJ sintético codificado por um constructo genético introduzido. Os promotores são representados por setas. O ácido nucleico é representado por blocos. As células B expressam o ácido nucleico que fica a jusante do promotor mais próximo ao intensificador E μ . No genoma de célula B endógeno representado na FIG. 9, o primeiro promotor a montante mais próximo do intensificador E μ conduz, então, à expressão dos segmentos VDJ endógenos da cadeia pesada. A introdução de um constructo genético que inclui um promotor entre o intensificador E μ e o primeiro promotor endógeno resulta na célula B expressando o constructo genético introduzido em vez dos segmentos VDJ endógenos da cadeia pesada. Esse gene introduzido poderia ser um região variável VDJ de uma cadeia pesada, uma cadeia

leve de anticorpo completa pareada com o VDJ variável da cadeia pesada, ou outro gene sintético que possa ser expresso pela fusão com uma região constante da cadeia pesada de uma célula B. Na FIG. 9, as regiões constantes são indicadas individualmente para destacar que o constructo genético introduzido pode ser expresso com qualquer uma das possíveis regiões constantes da cadeia pesada.

[026]FIG. 10. Regiões alvo para introdução (humanas). Regiões para a introdução do constructo genético no genoma: #1: da região terminal J (IGHJ6 em seres humanos, IGHJ4 em camundongos) ao intensificador E μ , ou #2: do intensificador E μ às sequências repetitivas da região de alternância do domínio constante.

[027]FIG. 11A, 11B. (FIG. 11A) intensificador intrônico E μ humano (SEQ ID N°: 85) e sequência de DNA humano a mirar para a introdução genética, incluindo de IGHJ6 ao intensificador intrônico E μ (SEQ ID N°: 1); (FIG. 11B) exemplos de sítios alvo de gRNA (por exemplo, sgRNA) (SEQ ID N° 5-24) e sequências de gRNA (SEQ ID N°: 88, 89 e 290-307) associados.

[028]FIGs. 12A, 12B. (FIG. 12A) Sequência de DNA humano a mirar para a introdução genética, incluindo do intensificador intrônico E μ à região de alternância (SEQ ID N°: 2); (FIG. 12B) exemplos de sítios alvo de gRNA (por exemplo, sgRNA) (SEQ ID N° 25-44) e sequências de gRNA (SEQ ID N°: 308-327) associados.

[029]FIGs. 13A, 13B. (FIG. 13A) intensificador intrônico E μ murídeo (SEQ ID N°: 86) e sequência de DNA murídeo a mirar para introdução genética, incluindo de IGHJ4 ao intensificador intrônico E μ (SEQ ID N°: 3); (FIG. 13B) exemplos de sítios alvo de gRNA (por exemplo, sgRNA) (SEQ ID N°: 45-64) e sequências de gRNA (SEQ ID N°: 87 e 328-346) associados.

[030]FIGs. 14A, 14B. (FIG. 14A) sequência de DNA murídeo a mirar para a introdução genética, incluindo do intensificador intrônico E μ à região de alternância (SEQ ID N°: 4); (FIG. 14B) exemplos de sítios alvo de gRNA (por exemplo, sgRNA)

(SEQ ID Nº 65-84) e sequências de gRNA (SEQ ID Nº: 347-366) associados.

[031]FIGs. 15A, 15B. A FIG. 15A é uma representação esquemática ilustrando a introdução de um constructo genético que codifica um anticorpo anti-RSV em um lócus de cadeia pesada endógeno utilizando um sistema de edição gênica CRISPR/Cas9. O constructo genético pode incluir braços ou suturas de homologia, que são *overhangs* de nucleotídeos que são homólogos ao DNA genômico no sítio de introdução. A FIG. 15B ilustra exemplos adicionais de modelos de reparo de DNA que incluem sequências flanqueadas por sítios alvo de sgRNA para gerar quebras de DNA de fita dupla flanqueando uma sequência introduzida de acordo com o corte de Cas9/sgRNA do genoma (topo), DNA de fita simples contendo braços de homologia longos flanqueando uma sequência introduzida (centro), e braços de homologia curtos flanqueando uma sequência introduzida produzida por anelamento de um oligo de DNA (base).

[032]FIG. 16. Representação esquemática ilustrando: (topo) um lócus de cadeia pesada modificado com um constructo genético que codifica uma região variável de cadeia pesada de um anticorpo anti-RSV; (centro) um lócus de cadeia leve modificado com um constructo genético que codifica uma região variável de cadeia leve de um anticorpo anti-RSV; e (base) um lócus de cadeia pesada modificado com um constructo genético que codifica uma cadeia leve (isto é, IgL) de um anticorpo anti-RSV e uma região variável de cadeia pesada de um anticorpo anti-RSV com um ligante (incluindo uma Strep-Tag) entre a cadeia leve e a região variável de cadeia pesada.

[033]FIG. 17. Representação esquemática da proteção simultânea contra vários patógenos por células B de memória modificadas e por células B secretoras de anticorpos modificadas, conforme reveladas neste documento.

[034]FIGs. 18A-18C. Corte eficaz por Cas9 de uma região intrônica almejada em células B murídeas e humanas. Eletroporação com corte eficaz mediado por

complexos de proteínas ribonucleares Cas9/sgRNA em células B murídeas e humanas. As células foram eletroporadas com complexos Cas9/sgRNA. A eficácia da edição foi avaliada 3 dias após a eletroporação por Rastreamento de Indels por Decomposição (TIDE) em: (FIG. 18A) linha de células B murídeas (A20); (FIG. 18B) células B primárias; e (FIG. 18C) linha de células B humanas (Ramos).

[035]FIG. 19. Introdução de um constructo genético que codifica um anticorpo específico do RSV em células B murídeas.

[036]FIG. 20. Enriquecimento e análise de células B geneticamente modificadas.

[037]FIG. 21. Células B geneticamente modificadas secretam anticorpos que ligam-se ao RSV.

[038]FIGs. 22A, 22B. As abordagens de junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e junção de extremidades micro-homólogas (MMEJ) são alternativas ao longo reparo dirigido por homologia (HDR) para a engenharia do genoma de células B murídeas primárias. (FIG. 22A) Células B primárias foram iniciadas por 24 horas, co-incubadas com vírus adeno-associado (AAV) por 12 horas, lavadas e ou eletroporadas ou transferidas diretamente à cultura secundária por 3 dias antes da análise da expressão de mCherry. (FIG. 22B) Células B primárias foram iniciadas por 24 horas, eletroporadas com mock ou eletroporadas com modelo + Cas9/sgRNA e transferidas a uma cultura secundária por 5 dias antes da análise da expressão de mCherry.

[039]FIGs. 23A-23E. A introdução de um novo constructo genético que codifica um anticorpo funcional em linhas de células B murídeas e humanas permite a expressão de anticorpos ligados à superfície e de anticorpos secretados. (FIG. 23A) Diagrama do lócus da IgH ilustrando o local para a introdução de um constructo de anticorpo parcial, bem como representações de um anticorpo ligado à superfície e anticorpo secretado. emAb = anticorpo sintético, usado neste documento de maneira

intercambiável com synAb. (FIG. 23B) Coloração de linhas de células B murídeas A20 não modificadas ou modificadas com anticorpo sintético anti-RSV (synAb αRSV) usando o tetrâmero da proteína F pré-fusão do RSV (Tetrâmero RSV) e o tetrâmero de anti-Streptag II (Tetrâmero αTagAb). (FIG. 23C) Coloração de linhas de células B humanas RAMOS não modificadas ou modificadas com synAb anti-RSV usando o tetrâmero pré-fusão do RSV e o tetrâmero do anticorpo anti-Streptag II. (FIG. 23D) ELISA acerca da ligação do anticorpo com a proteína F pré-fusão do RSV em meios de cultura de células A20 não modificadas ou células A20 modificadas com synAB anti-RSV. O palivizumabe foi usado como controle positivo. (FIG. 23E) ELISA acerca da ligação do anticorpo com a proteína F pré-fusão do RSV em meios de cultura de células RAMOS não modificadas ou modificadas com synAb anti-RSV. O palivizumabe foi usado como controle positivo.

[040]FIGs. 24A-24C. Produção de células B murídeas primárias com uma nova especificidade. (FIG. 24A) Coloração da superfície de linhas de células B murídeas tratadas com mock (topo) ou modificadas com synAb anti-RSV (base) usando o tetrâmero de anti-Streptag II antes do enriquecimento (painel esquerdo) e depois do enriquecimento e expansão usando o tetrâmero de anti-Streptag II (painel central) e tetrâmeros da proteína viral pré-fusão do RSV (painel direito). (FIG. 24B) ELISA acerca da ligação do anticorpo com a proteína F pré-fusão do RSV em meios de cultura de células B murídeas não modificadas ou modificadas com synAb anti-RSV. O palivizumabe foi usado como controle positivo. Ligação com o anticorpo detectada usando uma mistura a 1:1 de Ig anti-humana policlonal e Ig anti-murídea ligada a HRP. (24C) Rápida expansão de células B com synAb enriquecidas em cultura com células alimentadoras 3T3-CD40L e IL-21.

[041]FIGs. 25A-25I. Sequências exemplificativas. (FIG. 25A) Exemplos de sequências de sgRNA (SEQ ID N°: 87, 88, 89), regiões de homologia de genoma (SEQ ID N°: 90-95) e oligonucleotídeos de *splicing* (SEQ ID N°: 96-101); (FIG. 25B)

AAV com emAb anti-RSV humano (sequência de 2.531 bp (SEQ ID Nº: 102) e sequências de nucleotídeo e proteína associadas (SEQ ID Nº: 110-126, 280, 285)); (FIG. 25C) AAV com emAb anti-RSV murídeo (sequência de 3.134 bp (SEQ ID Nº: 103) e sequências de nucleotídeo e proteína associadas (SEQ ID Nº: 127-141, 281, 286)); (FIG. 25D) dsDNA com emAb anti-RSV murídeo (sequência de 1.736 bp (SEQ ID Nº: 104) e sequências de nucleotídeo e proteína associadas (SEQ ID Nº: 142-144)); (FIG. 25E) emAb-VRC01-AAV humano (sequência de 2.551 bp (SEQ ID Nº: 105) e sequências de nucleotídeo e proteína associadas (SEQ ID Nº: 145-152, 282, 287)); (FIG. 25F) emAb-Medi8852-AAV humano (sequência de 2.544 bp (SEQ ID Nº: 106) e sequências de nucleotídeo e proteína associadas (SEQ ID Nº: 153-160, 283, 288)); (FIG. 25G) emAb-AMM01-AAV humano (sequência de 2.555 bp (SEQ ID Nº: 107) e sequências de nucleotídeo e proteína associadas (SEQ ID Nº: 161-169, 284, 289)); (FIG. 25H) sequência de integração de mRSV-*splice* em Balb/C (sequência de 2.261 bp (SEQ ID Nº: 108) e sequências de nucleotídeo e proteína associadas (SEQ ID Nº: 170-172)); e (FIG. 25I) sequência integrada de TT-hRSV-T7 (sequência de 1.707 bp (SEQ ID Nº: 109) e sequências de nucleotídeo e proteína associadas (SEQ ID Nº: 173-175)).

[042]FIGs. 26A-26D. (FIG. 26A) Área almejada a montante do intensificador Eμ para introdução de um novo cassete de anticorpo; ao mirar essa região, os genes de emAb introduzidos podem ser conduzidos por um promotor da IgH nativo (não introduzido), maximizando assim o controle nativo de expressão da imunoglobulina. Para permitir a introdução em um só golpe e minimizar interações fora do alvo, os constructos de emAb foram expressos por uma fusão de cadeia única. Essa fusão consiste em uma sequência de cadeia leve completa, ligada à região variável da cadeia pesada com um ligante glicina-serina de 57 aminoácidos. A ligação física das cadeias leve e pesada minimiza o risco de pareamento equívoco entre um emAb introduzido e a cadeia leve endógena. Uma junção de *splice* otimizada permite que

os emAbs unam-se por *splicing* a jusante das regiões constantes endógenas da IgH. Isso permite que os emAbs sejam expressos por qualquer uma das classes de isótopos de cadeia pesada. (FIG. 26B) A linha de células B derivada do linfoma de Burkitt expressa nativamente formas da IgM na superfície e secretadas pareadas com uma cadeia leve lambda. A expressão de um emAb α RSV manipulado derivado do palivizumabe foi detectada usando a proteína RSV-F monomérica e estreptactina, uma estreptavidina modificada com alta afinidade pelos motivos de Streptag II no ligante. α Células RAMOS modificadas com emAb anti-RSV expressaram o anticorpo específico do RSV manipulado, que pôde ser detectado na superfície das células. (FIG. 26C) O anticorpo específico do RSV também foi detectado na forma secretada no sobrenadante. (FIG. 26D) As células modificadas com emAb α RSV exibiram, mas as células controle não, a sinalização rápida e sustentada de cálcio em resposta ao antígeno de proteína.

[043]FIGs. 27A-27G. Células B humanas são geneticamente modificadas com eficácia para expressar o emAb de cadeia única por distribuição de cas9-sgRNA pareados e de um modelo de AAV. (FIG. 27A) Representação esquemática do processo de engenharia de células humanas. Dia 0: Células B são isoladas de PBMC e iniciadas com CD40L, IL2, IL10, IL15 e oligonucleotídeos CpG. Dia 2: as células são eletroporadas com RNP cas9/sgRNA e tratadas com um AAV que codifica o modelo de emAb HR 1 hora após a eletroporação, seguida por cultivo conforme descrito para o dia 0. Dia 4: as células são selecionadas com base na ligação com antígeno ou expressão de uma etiqueta. Dias 4-15L: as células selecionadas são expandidas sobre células alimentadoras irradiadas que expressam CD40L, IL2 e IL21, suplementadas com IL15. Dias 15-18: as células são transferidas a uma cultura de diferenciação sem células alimentadoras com IL6, IL15 e IFNy. (FIG. 27B) Frequência de indels em células B de 6 doadores de PBMC independentes tratados com RNPs Cas9/sgRNA mirando o emAb. (FIG. 27C) Todas

as SNPs humanas com a frequência ao longo de todo sítio de sgRNA mirado divulgada. (FIG. 27D) FACS representativo para a ligação do monômero F pré-fusão do RSV com o controle cultivado ou com células B humanas geneticamente modificadas com emAb anti-RSV no 4º dia de cultura. (FIG. 27E) Frequência de células B com emAb anti-RSV após a manipulação de células B de 6 doadores independentes. (FIG. 27F) FACS para etiquetas de células no plasma (CD19, CD27, CD38 e CD138) em células iniciadas (Dia 2) e células diferenciadas *in vitro* (Dia 18). (FIG. 27G) ELISA acerca do anticorpo anti-tronco da HA secretado no meio de cultura de células B controle ou células B com emAb MEDI8852 direcionadas ao influenza no 18º dia de cultura.

[044]FIG. 28. O emAb de cadeia única é uma plataforma flexível para a expressão de anticorpos antivirais. Células B humanas foram eletroporadas com mock (Controle B, fileira superior) ou geneticamente modificadas com constructos de emAb (fileira inferior) derivados das regiões variáveis dos constructos de anticorpo amplamente neutralizantes indicados e cadeias leves kappa (palivizumabe, VRC01 e MEDI8852) ou lambda (AMM01) humanas. As células controle e modificadas com emAb foram tingidas com um antígeno compatível derivado do patógeno indicado: monômero RSV-F, ou tetrâmetros de ENV do HIV, GH/GL do EBV ou tronco da HA.

[045]FIGs. 29A-29D. A introdução do emAb no alelo da IgH produtivo pode bloquear a produção endógena da IgH. (FIG. 29A) Diagrama de alelos da IgH de RAMOS: um alelo produtivo contendo um sítio alvo do emAb, e um alelo com uma translocação de c-myc eliminando o sítio alvo do emAb. (FIG. 29B) Citometria de fluxo ilustrando a expressão na superfície da ligação da cadeia leve lambda e do antígeno da RSV-F em células RAMOS de entrada (acionadas em CD79b+) e células RAMOS modificadas com emAb αRSV (acionadas em CD79b+/RSV-F+). (FIG. 29C) Diagrama de alelos da IgH primários: um alelo produtivo e um alelo não produtivo sem VDJ funcional recombinado, ambos os quais contêm um sítio alvo do

emAb. (FIG. 29D) Citometria de fluxo ilustrando a expressão na superfície da ligação da cadeia leve λ e do antígeno da RSV-F em uma cadeia leve λ classificada de entrada + células B (acionadas em CD79b+) e células B modificadas com emAb αRSV (acionadas em CD79b+/RSV-F+).

[046]FIG. 30A-30E. Engenharia de células B murídeas primárias com um cassete de emAb αRSV (FIG. 30A) Representação esquemática do processo de engenharia de células B murídeas. Dia 0: células B são isoladas do baço e dos linfonodos periféricos (PLN) por seleção negativa e iniciadas com CD40L-HA, mAb anti-HA e IL4. Dia 1: as células são eletroporadas com RNP cas9/sgRNA junto com dsDNA (condição de dsDNA) ou só com RNP cas9/sgRNA seguida por tratamento com AAV contendo o modelo de emAb HR 1 h após a eletroporação (condição de AAV). Depois disso, as células foram mantidas em cultura conforme descrito para o dia 0. Dia 3: as células são selecionadas com base na ligação com antígeno ou expressão de uma etiqueta. Dia 4-8L: as células selecionadas são expandidas sobre células alimentadoras irradiadas que expressam o CD40L, suplementadas com IL-21. (FIG. 30B) Porcentagem de indels em células B tratadas com RNP cas9/sgRNA mirando a IgH. (FIG. 30C) FACS representativo para ligação com a proteína F pré-fusão monomérica do RSV em células B controle, ou células B com emAb manipuladas usando um modelo de dsDNA ou AAV. (FIG. 30D) Frequências de células com emAb em células B modificadas com modelos de dsDNA ou AAV. (FIG. 30E) Anticorpo secretado específico anti-RSV no sobrenadante de células B controle, ou células B manipuladas usando um modelo de dsDNA ou AAV.

[047]FIGs. 31A-31D. Proteção contra a infecção viral por células B com emAb αRSV manipuladas. (FIG. 31A) Representação esquemática da proteção antiviral por células com emAb transferidas. Dia 0: $1,5 \times 10^7$ células B com emAb anti-RSV enriquecidas são transferidas por injeção IP. Dia 5: injeção IP de palivizumabe a 15 mg/kg. Dia 6: coleta de sangue para medir as titulações de Ab antiviral. Dia 7:

desafio intranasal com 10^6 pfu do vírus RSV. Dia 12: medição da titulação viral nos pulmões. (FIG. 31B) Expressão na superfície do receptor de emAb anti-RSV antes ou 24 depois da transferência de células com emAb anti-RSV medida pela ligação do monômero RSV-F e da etiqueta de estreptactina. (FIG. 31C) Titulação no plasma de anticorpos α RSV-F em camundongos no dia 6. (FIG. 31D) Titulações virais do RSV nos pulmões de camundongos sem células transfectadas, com células B com emAb α RSV, com células B controle, ou com 15 mg/kg de palivizumabe distribuídos por via IP 48 horas antes da infecção.

[048]FIGs. 32A, 32B. Transferência mutiplex de células secretoras de anticorpo humanas a camundongos NSG (FIG. 32A) Representação esquemática da transferência de células B com emAb a camundongos NSG. Dia 0: 5×10^6 células B com emAb anti-Flu e 5×10^6 células B com emAb anti-RSV produzidas conforme descrito na FIG. 27 foram transferidas por injeção IP. Dia 7: coleta de sangue para medir a produção de anticorpos no soro. (FIG. 32B) ELISA acerca das titulações no soro de anticorpos anti-RSV-F e anti-tronco da HA em camundongos que receberam células com emAb (transferência dupla) vs. soro controle (sem transferência).

[049]FIGs. 33A, 33B. Modelos para a introdução prolongada de cassetes de emAb nos lócus da IgH murídeos (FIG. 33A) e humanos (FIG. 33B). Na fileira superior, para cada genoma, é indicada a posição dos elementos nos lócus da IgH de linha germinativa, incluindo as regiões J finais, o elemento intensificador intrônico E μ e o início do domínio constante μ . A posição do sítio alvo da cas9/sgRNA é indicada (sítio cortado). Abaixo, são ilustradas as posições dos braços de homologia alvo incluídos nos constructos de AAV e dsDNA murídeos (FIG. 33A) bem como no constructo de AAV humano (FIG. 33B). Também é ilustrado o cassete de emAb conforme introduzido no genoma.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[050]As vacinas são desenvolvidas para aumentar a imunidade de um

paciente contra uma infecção específica ao estimular as células B a produzir anticorpos contra o agente infeccioso almejado. Os anticorpos são proteínas que oferecem proteção contra patógenos. Os anticorpos podem ligar-se a um patógeno e são considerados protetores quando essa ligação interfere na função normal do patógeno. Por exemplo, muitos anticorpos protetores ligam-se a uma porção de um patógeno que o impede de penetrar nas células. Os anticorpos podem ligar-se à superfície de células B (conhecidos como receptores de célula B), mas exercem a maior parte de suas funções protetoras quando secretados no sangue.

[051]"Patógeno" pode referir-se a qualquer substância capaz de causar uma doença, e "patogênico" refere-se à capacidade de uma substância de causar uma doença. Exemplos de patógenos incluem vírus, bactérias e fungos capazes de infectar um hospedeiro e causar uma doença. Outros exemplos de patógenos incluem proteínas derivadas do hospedeiro ou outras substâncias derivadas do hospedeiro capazes de causar uma doença, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), uma molécula inflamatória associada a inúmeras condições autoimunes (por exemplo, artrite), e placas beta-amiloides, proteínas fibrosas que acumulam-se no cérebro no mal de Alzheimer. Em modalidades específicas, células cancerosas e/ou tumores também podem ser aludidos como patógenos ou substâncias patogênicas, com base em sua capacidade de causar uma doença.

[052]Quando da exposição a uma vacina ou patógeno natural, um epítopo incluído na vacina e/ou presente no patógeno pode ligar-se a um receptor de célula B presente em uma célula B virgem. Essa ligação leva à ativação da célula B e à produção de anticorpos protetores.

[053]Uma célula B virgem refere-se a uma célula B antes de ela entrar em contato com seu epítopo. Cada célula B virgem expressa um anticorpo próprio com uma especificidade de epítopo própria. O anticorpo próprio expresso por cada célula B virgem é gerado aleatoriamente através de recombinação genética. As células B

virgens expressam anticorpos ligados à membrana (isto é, receptores de célula B) e, quando da ligação com um epítopo, proliferam-se rapidamente. Durante a proliferação e maturação, os genes de anticorpo sofrem mutação somática, que serve para aumentar a afinidade de ligação com o epítopo. O aumento na afinidade de ligação com o epítopo que ocorre durante a maturação das células B é necessário para a proteção eficaz contra o patógeno. Uma única célula B virgem é capaz de sofrer dezenas de divisões celulares para criar milhares de células B secretoras de anticorpos e células B de memória (FIG. 1) expressando um mesmo anticorpo, ou um anticorpo relacionado que foi mutado para aprimorar sua ligação com o patógeno.

[054] Além de células B secretoras de anticorpos ativas, as células B de memória são importantes na proteção contra patógenos. As células B de memória normalmente não secretam ativamente anticorpos, mas podem diferenciar-se rapidamente em células secretoras de anticorpos. A rápida diferenciação das células B de memória em células secretoras de anticorpos pode ajudar o sistema imunológico a montar uma rápida resposta contra uma infecção secundária ou patógeno já enfrentados antes por vacinação (McHeyzer-Williams *et al.*, *Nat Rev Immunol.*, 2011; 12(1):24-34; Taylor *et al.*, *Trends Immunol.*, 2012; 33(12):590-7). Por exemplo, as células B de memória mantêm a proteção contra o vírus da Hepatite B quando o nível de anticorpos produzidos pelas células B secretoras de anticorpos diminui (Williams *et al.*, *Vaccine*, 2001; 19(28-29):4081-5; Bauer *et al.*, *Vaccine*, 2006; 24(5):572-7). Logo, vacinas bem-sucedidas estimulam a geração de células B secretoras de anticorpos e células B de memória longevas, todas capazes de expressar anticorpos que ligam-se a um epítopo no patógeno com alta afinidade.

[055] Infelizmente, há muitos agentes infecciosos contra os quais não há vacinas disponíveis. Exemplos de agentes infecciosos sem uma estratégia de vacinação eficaz disponível incluem o RSV, o HIV e o Zika vírus.

[056]No que diz respeito ao RSV, o fracasso retumbante de uma vacina de RSV inativado com formalina nos anos 1960 provavelmente não deveu-se a falha em induzir células B secretoras de anticorpos e células B de memória que mirassem o RSV. É provável que a vacina tenha induzido à produção de anticorpos que não neutralizaram o RSV, mas, em vez disso, intensificaram a infecção pelo mesmo (FIG. 2A) (Blanco *et al.*, *Hum. Vaccin.*, 2010; 6(6):482-92; Broadbent *et al.*, *Influenza Other Respir. Viruses*, 2015; 9(4):169-78). Fica enfatizado assim o delicado equilíbrio que deve ser obtido pelas vacinas: a indução à produção de anticorpos “protetores” que miram certos epítopos ao mesmo tempo em que evitam o estímulo à produção de anticorpos “patogênicos” que miram os epítopos errados (FIG. 2A).

[057]Uma análise de 2015 da Plataforma Internacional para Registro de Ensaios Clínicos da Organização Mundial da Saúde identificou nove candidatos a vacina do RSV avaliados clinicamente desde 2008, nenhum dos quais passou da Fase de testes 2 (Broadbent *et al.*, *Influenza Other Respir. Viruses*, 2015; 9(4):169-78). Desses, só três ensaios foram concluídos e só um teve os resultados divulgados. Essa vacina, chamada de MEDI-559, parece reduzir a infecção pelo RSV, mas os sintomas respiratórios foram demasiados para que se realizassem novos testes (Malkin *et al.*, *PLoS One*, 2013; 8(10):e77104). Esses dados sugerem que, embora a MEDI-559 tenha induzido à produção de anticorpos protetores, é provável que também tenha induzido à produção de anticorpos patogênicos (FIG. 2B).

[058]Outras estratégias de vacinação “aprimorada” envolvem mudar a fórmula que é administrada aos pacientes. Essas incluem métodos alternativos para inativar/atenuar o vírus e mudanças ao adjuvante destinadas a aumentar a resposta inflamatória (Broadbent *et al.*, *Influenza Other Respir. Viruses*, 2015; 9(4):169-78; Garg *et al.*, *The Journal of general virology*, 2014; 95(Pt 5):1043-54; Swanson *et al.*, *J. Virol.*, 2014; 88(20):11802-10; Widjaja *et al.*, *PLoS One*, 2015; 10(6):e0130829;

Stewart-Jones *et al.*, *PLoS One*, 2015; 10(6):e0128779). Algumas dessas abordagens produziram aumento nos anticorpos protetores em modelos animais, mas a possibilidade de induzir anticorpos patogênicos torna provável que essas vacinas de RSV "aprimoradas" sofreriam do mesmo destino que a MEDI-559.

[059]Na tentativa de concentrar a resposta imunológica nos epítopos mirados por anticorpos protetores, uma abordagem recente consistiu em enxertar um único epítopo do RSV em um arcabouço não RSV (FIG. 2C). Essa abordagem elimina a possibilidade de anticorpos patogênicos específicos para outros epítopos do RSV visto que eles fazem-se ausentes do arcabouço. A vacinação do macaco reso com um arcabouço de epítopo do RSV resultou na produção de anticorpos neutralizantes por alguns animais, mas só depois de 3 a 5 injeções (Correia *et al.*, *Nature*, 2014; 507(7491):201-6).

[060]Também foram elaboradas abordagens para contornar a vacinação e prover anticorpos protetores diretamente. O único tratamento profiláctico clinicamente aprovado contra o RSV é a injeção do anticorpo protetor específico do RSV de alta afinidade palivizumabe (FIG. 3A) (*The PREVENT Study Group. Pediatrics*, 1997; 99(1):93-9; *The IMPACT-RSV Study Group. Pediatrics*, 1998; 102(3 Pt 1):531-7). Infelizmente, o custo de \$10.000 por uma série de 5 meses de palivizumabe limitou seu uso a crianças com alto risco de infecção pelo RSV (Meissner & Kimberlin, *Pediatrics*, 2013; 132(5):915-8). Outros anticorpos específicos do RSV projetados para durar até um ano ainda estão sendo submetidos a avaliação clínica (*Influenza Other Respir. Viruses*, 2015; 9(4):169-78). No entanto, a re-injeção anual de anticorpos não é viável para a proteção vitalícia.

[061]Para eliminar a necessidade por injeções por toda a vida, foram desenvolvidos métodos nos quais um vetor adenoviral é usado para transferir um gene que codifica um anticorpo protetor a células musculares (FIG. 3B) (Schnepp & Johnson, *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2014; 9(3):250-6). Promissoramente, a expressão

de palivizumabe mediada por adenovírus protegeu em parte os camundongos contra infecção pelo RSV (Skaricic *et al.*, *Virology*, 2008; 378(1):79-85). Uma limitação dessa abordagem, porém, são os altos custos para fabricar as altas doses de vírus necessárias para obter níveis protetores dos anticorpos (24). Doses elevadas são necessárias porque a expressão do anticorpo por uma célula muscular é baixa em comparação aos estimados 10.000 anticorpos secretados por segundo por uma única célula B (Helmreich *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1961; 236:464-73; Hibi & Dosch, *Eur. J. Immunol.*, 1986; 16(2):139-45). As células B obtêm essa taxa de secreção elevada porque reprogramam por completo seu maquinário de produção de proteínas para focar na secreção de anticorpos. Sem uma revolução nas capacidades de fabricação, a transferência de genes de anticorpo a células musculares mediada por adenovírus não é uma opção realista para a prevenção do RSV.

[062]Outra abordagem faz uso de um vetor lentiviral para incorporar os genes que codificam anticorpos protetores ao genoma de células-tronco hematopoiéticas, que seriam subsequentemente induzidas a diferenciar-se em células B secretoras de anticorpos (FIG. 3C). Uma limitação dessa abordagem é que a introdução de genes de anticorpo é aleatória, o que traz o risco de efeitos genéticos fora do alvo, que poderiam provocar uma doença. Uma segunda limitação dessa abordagem são as condições de cultura *in vitro* de dois meses de duração necessárias para induzir à diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em células secretoras de anticorpos (Luo *et al.*, *Blood*, 2009; 113(7):1422-31). Uma última limitação é que essa estratégia não geraria uma fonte de anticorpos capaz de ser ampliada quando de uma infecção. Logo, se as células secretoras de anticorpos não se fizerem presentes em grandes quantidades, ou não tiverem uma vida longa, a proteção contra a infecção será inadequada.

[063]Em modalidades específicas, a presente invenção propõe contornar a vacinação e/ou eliminar a necessidade de repetidas injeções terapêuticas de

anticorpos ao manipular geneticamente células B para que expressem um anticorpo selecionado (por exemplo, palivizumabe; FIG. 4A). Tipos de células B que são particularmente úteis para manipular geneticamente incluem as células B secretoras de anticorpos, células B de memória, células B virgens, células B B1 e células B da zona marginal existentes. As células B virgens têm o maior potencial proliferativo e funcional de todas e podem entrar na resposta do centro germinativo e aprimorar sua própria capacidade de ligação. As células B B1 expressam o BCR e migram para diferentes localizações, tais como a cavidade peritoneal. As células B B1 diferenciam-se rapidamente em células secretoras de anticorpos quando do estímulo através do BCR e não requerem sinais para células T para a função ideal. As células B da zona marginal localizam-se em grande medida na zona marginal do baço e diferenciam-se rapidamente em células secretoras de anticorpos quando do estímulo através do BCR. As células B da zona marginal também não requerem sinais advindos de células T para a função ideal. A engenharia genética de um ou mais desses subconjuntos de células B pode criar um nível padrão de referência de anticorpos para tratar uma infecção em andamento ou imediata e uma fonte de anticorpos longeva e induzível em caso de re-infecção futura. A FIG. 4B ilustra uma estratégia associada à proteção simultânea contra inúmeros patógenos utilizando os ensinamentos da presente invenção, ao passo que a FIG. 5 ilustra a secreção hipotética de palivizumabe a partir de subtipos de células B exemplificativos na presença e ausência de uma infecção.

[064]A presente invenção propõe a engenharia genética de células B inserindo-se um constructo com um transgene em um lócus de gene de anticorpo endógeno escolhido especificamente para tirar proveito da estrutura e função do genoma de célula B endógeno. Por exemplo, a introdução de um transgene que codifica ao menos uma porção de um anticorpo selecionado em um lócus de gene de anticorpo endógeno pode permitir a produção robusta do anticorpo selecionado

ao tirar proveito do maquinário regulador da expressão do anticorpo endógeno. "Transgene" pode referir-se a uma seção de DNA que codifica uma proteína estranha (isto é, exógena). "Constructo genético" pode referir-se a um segmento de ácido nucleico construído artificialmente, o qual destina-se à introdução em uma célula para permitir a expressão da proteína estranha.

[065]Em modalidades específicas, a presente invenção propõe células B que são modificadas para expressar um anticorpo selecionado. Os anticorpos são produzidos a partir de dois genes, um gene de cadeia pesada e um gene de cadeia leve. Em termos gerais, um anticorpo inclui duas cópias idênticas de uma cadeia pesada e duas cópias idênticas de uma cadeia leve (vide, por exemplo, a FIG. 6B). As cadeias pesadas são as maiores subunidades das duas e cada cadeia pesada inclui um segmento VDJ e uma região constante (representada por "C" na FIG. 6B). O segmento VDJ (ou VDJ) refere-se ao pareamento singular dos segmentos gênicos V, D e J, que codificam a porção singular das cadeias pesadas de anticorpo que liga-se a um epítopo em um patógeno. Sendo assim, V refere-se a um dos segmentos gênicos que pareia aleatoriamente com um segmento D e J para codificar uma porção singular da cadeia pesada de anticorpo que liga-se a um epítopo no patógeno. À semelhança, D refere-se a um dos segmentos gênicos que pareia aleatoriamente com um segmento V e J para codificar a porção singular da cadeia pesada de anticorpo que liga-se a um epítopo no patógeno. Por fim, J refere-se a um dos segmentos gênicos que pareia aleatoriamente com um segmento V e D para codificar a porção singular da cadeia pesada de anticorpo que liga-se a um epítopo no patógeno. Há vários segmentos V, segmentos D e segmentos J que podem unir-se em uma variedade de diferentes combinações para formar o segmento VDJ específico de uma cadeia pesada específica (vide, por exemplo, a FIG. 7).

[066]Cada célula B pareia uma única combinação VDJ com uma região

constante (C) conservada para formar uma cadeia pesada de comprimento total. A região C da cadeia pesada pode interagir com outras proteínas imunológicas, tais como receptores de Fc, para ativar outras células imunológicas. Todas as células B virgens expressam os mesmos segmentos de região C, mas podem transformar-se para expressar segmentos de região C diferentes seguindo-se à ativação, sendo que regiões C diferentes dão aos anticorpos funções diferentes. Por exemplo, um segmento gênico C codifica ϵ , e os anticorpos que expressam ϵ são “IgE”. Os anticorpos do tipo IgE ligam-se a células do corpo e geralmente medeiam reações alérgicas. Os anticorpos que expressam uma região C α são anticorpos IgA; os anticorpos que expressam uma região C γ são anticorpos IgG, e os anticorpos que expressam uma região C μ são anticorpos IgM. O genoma humano inclui um único lócus de cadeia pesada, o qual se faz presente no cromossomo 14.

[067]Com referência novamente à FIG. 6B, a cadeia leve de um anticorpo (IgL) inclui uma região variável e uma região constante. A região variável da cadeia leve inclui os segmentos gênicos V e J, e a região constante da cadeia leve pode incluir um único domínio constante da imunoglobulina. Os seres humanos expressam duas cadeias leves diferentes: Igk, que é codificada pelo lócus kappa da imunoglobulina no cromossomo 2; e Ig λ , que é codificada pelo lócus lambda da imunoglobulina no cromossomo 22.

[068]A FIG. 6A ilustra representações esquemáticas de genomas endógenos de células B que codificam uma cadeia IgH e uma cadeia IgL. As FIGs. 8A e 8B ilustram representações esquemáticas iniciais de onde constructos genéticos exógenos de acordo com a presente invenção podem ser introduzidos para obter a expressão de um anticorpo selecionado. A FIG. 8A ilustra a introdução de um constructo genético que inclui [um sinal de parada, uma cadeia IgL de um anticorpo selecionado (aqui, PV), um elemento saltador (aqui, 2A) e o segmento VDJ de uma cadeia pesada] no genoma de IgH endógeno entre o segmento VDJ endógeno e os

segmentos codificantes da região C endógenos. A presente abordagem leva à expressão de uma cadeia IgL exógena, um segmento VDJ exógeno e uma região C endógena da cadeia pesada. A expressão de um anticorpo que inclui uma região C endógena pode ser útil, por exemplo, porque pode permitir que uma célula B modificada module a expressão da região C com base na ativação e no estado de maturação naturais da célula B. Por exemplo, o *splicing* alternativo na região constante do lócus do gene de cadeia pesada pode permitir que uma célula B modificada alterne entre a expressão de um anticorpo ligado à membrana e a expressão de um anticorpo secretado. Essa abordagem também permite a expressão de um VDJ exógeno sem a necessidade de extirpar o VDJ endógeno. Essa característica é benéfica porque o VDJ é um segmento relativamente grande do DNA e sua extirpação poderia afetar negativamente a função celular.

[069]A FIG. 9 ilustra uma representação esquemática com mais detalhes no que diz respeito à estrutura e função do genoma endógeno das células B e a como a presente invenção utiliza essa estrutura e função para obter a expressão de anticorpos selecionados. As regiões promotoras são necessárias para obter a transcrição de um segmento gênico. Os promotores da região variável da cadeia pesada (V_H) são seletivamente ativos na linhagem de células B e incluem uma caixa TATA, um elemento Inr e um elemento de octâmero dentro de 100 pares de bases (bp) do sítio de iniciação transcrecional. A atividade do promotor V_H encontra-se sob regulação dependente de proximidade do elemento intensificador E_{μ} do genoma de célula B (ovoide cinza) e de um elemento intensificador posicionado na extremidade 3' do lócus do gene de cadeia pesada, proximalmente ao gene constante α da cadeia pesada (círculo cinza). O elemento intensificador E_{μ} é uma região intrônica do DNA (40 a 1.500 bp de extensão) dentro do ítron de 700 bp entre o segmento de cadeia pesada J e o segmento mu (μ) da cadeia constante C do lócus do gene de cadeia pesada da imunoglobulina. Ele pode ligar-se a uma proteína ativadora para

aumentar ou ativar a transcrição do gene de cadeia pesada. A sequência do elemento intensificador E μ humano é dada na FIG. 11A pela SEQ ID Nº: 85. A sequência do elemento intensificador E μ murídeo é dada na FIG. 13A pela SEQ ID Nº: 86.

[070]A introdução de um constructo genético com um promotor V_H entre uma região variável de cadeia pesada endógena e um intensificador E μ endógeno pode reduzir ou bloquear a ativação da transcrição pelo promotor V_H endógeno porque o intensificador E μ iniciará a transcrição no promotor a montante mais proximal. Dessa forma, a expressão do VDJ endógeno pode ser bloqueada sem necessidade de remover um segmento de DNA grande assim (o que, como mencionado, seria problemático para a função e sobrevivência celulares). Em modalidades específicas, a recombinação VDJ remove o material genético entre o promotor V_H e o intensificador E μ , o que coloca o intensificador a uma distância apropriada em relação ao promotor exógeno de um constructo genético revelado neste documento para ativar a transcrição partindo do promotor no constructo genético introduzido. Em modalidades específicas, nenhum material genético endógeno é removido. Em modalidades específicas, menos de 50 pares de bases são removidos. Em modalidades específicas, promotores de V_H dentro dos constructos genéticos exógenos incluem o promotor de cadeia leve para a IgK ou IgL nativo, um promotor da IgH humana nativo, o promotor do vírus formador de focos no baço (SFFV), o promotor J558 h10 ou o promotor IgVH1-69.

[071]A FIG. 10 ilustra uma representação esquemática de áreas alvo para a introdução do constructo genético. Essas áreas alvo abrangem duas regiões conservadas presentes em todas as células B: do segmento gênico terminal J (IGHJ6 nos seres humanos, IGHJ4 nos camundongos) ao intensificador intrônico da cadeia pesada (E μ), e do E μ às sequências repetitivas associadas à recombinação para alternância do DNA.

[072] Em modalidades específicas, a área do genoma de células B endógeno que é mirada para a introdução do constructo genético é a montante do intensificador E μ de SEQ ID N^º: 85 ou 86. As FIGs. 11A a 14B ilustram sequências específicas que podem ser miradas para a introdução do constructo genético a fim de obter a expressão de um anticorpo selecionado conforme revelado neste documento.

[073] A FIG. 11A ilustra a sequência de DNA humano de IGHJ6 ao intensificador intrônico E μ (SEQ ID N^º: 1; >hg38_dna range=chr14:105862523-105863244 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none). A FIG. 11B ilustra exemplos de extensões para mirar (por exemplo, sítios de gRNA) dentro dessa sequência, incluindo as SEQ ID N^º: 5-24 e sequências de gRNA associadas (SEQ ID N^º: 88, 89 e 290-307). Por exemplo, em modalidades específicas, o sgRNA da SEQ ID N^º: 88 (vide também a FIG. 25A) pode ser usado para mirar o sítio de gRNA alvo da SEQ ID N^º: 7. Em modalidades específicas, o sgRNA da SEQ ID N^º: 89 (vide também a FIG. 25A) pode ser usado para mirar o sítio de gRNA alvo da SEQ ID N^º: 10.

[074] A FIG. 12A ilustra a sequência de DNA humano para a região 2: intensificador intrônico E μ à região de alternância (SEQ ID N^º: 2; >hg38_dna range=chr14:105860383-105861690 5'pad=0 3'pad=0 strand=-). A FIG. 12B ilustra exemplos de extensões para mirar (por exemplo, sítios de gRNA) dentro dessa sequência, incluindo as SEQ ID N^º: 25-44 e sequências de gRNA associadas (SEQ ID N^º: 308-327).

[075] A FIG. 13A ilustra a sequência de DNA murídea para a região 1: de IGHJ4 ao intensificador intrônico E μ (SEQ ID N^º: 3; >mm10_dna range=chr12:113427973-113428554 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none). A FIG. 13B ilustra exemplos de extensões para mirar (por exemplo, sítios de gRNA) dentro dessa sequência, incluindo as SEQ ID N^º: 45-64 e

sequências de gRNA associadas (SEQ ID Nº: 87 e 328-346). Por exemplo, em modalidades específicas, o sgRNA da SEQ ID Nº: 87 (vide também a FIG. 25A) pode ser usado para mirar o sítio de gRNA alvo da SEQ ID Nº: 46.

[076]A FIG. 14A ilustra a sequência de DNA murídeo para a região 2: do intensificador intrônico E μ à região de alternância (SEQ ID Nº: 4; >mm10_dna range=chr12:113425446-113426973 5'pad=0 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none). A FIG. 14B ilustra exemplos de extensões para mirar (por exemplo, sítios de gRNA) dentro dessa sequência, incluindo as SEQ ID Nº: 65-84 e sequências de gRNA associadas (SEQ ID Nº: 347-366).

[077]Sendo assim, em modalidades específicas, a presente invenção propõe a introdução de um constructo genético que inclui (i) um promotor e (ii) um transgene que codifica uma porção de um anticorpo selecionado em uma região intrônica que é constante em todas as células B (antes e depois da recombinação) e que é (i) posicionado em relação a um elemento intensificador que interage com o promotor; e (ii) em uma configuração tal que a sequência VDJ endógena da cadeia pesada da célula B não seja expressa. Em modalidades específicas, a porção codificada do anticorpo selecionado inclui a cadeia leve completa do anticorpo e o segmento VDJ da cadeia pesada. Essas porções do anticorpo selecionado podem ser expressas com uma região constante da cadeia pesada expressa pela célula B modificada a qualquer tempo. Modalidades específicas do constructo genético também podem incluir ou codificar um peptídeo de sinal, um ligante flexível, um elemento saltador e uma junção de *splice*.

[078]Um desafio técnico da presente invenção é que um anticorpo é uma proteína composta por dois produtos gênicos distintos, a cadeia pesada (IgH) e a cadeia leve (IgL) (FIGs. 6A, 6B). Isso significa que, em modalidades específicas, ambas as localizações genéticas devem ser modificadas simultaneamente a fim de expressar adequadamente um anticorpo selecionado. No entanto, a presente

invenção também revela estratégias para produzir anticorpos selecionados funcionais sem a necessidade de modificar ambas as localizações genéticas. Uma abordagem que permite isso é pelo uso de sequências que possibilitam a expressão de anticorpos através de um único constructo. Em modalidades específicas, isso é obtido incluindo-se um elemento saltador dentro do constructo genético. Um exemplo de elemento saltador é um peptídeo auto-clivante, tal como um peptídeo auto-clivante “2A”. Os peptídeos 2A atuam fazendo com que o ribossomo pule a síntese de uma ligação peptídica em uma localização definida, ocasionando assim a produção de duas proteínas a partir de um mesmo mRNA. As sequências de 2A são curtas (por exemplo, de 20 aminoácidos), facilitando assim o uso em constructos de tamanho limitado, e as proteínas são produzidas com uma razão de 1:1. Exemplos específicos incluem T2A (GSG)EGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID Nº: 176); P2A (GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID Nº: 177); E2A (GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPGPP (SEQ ID Nº: 178); e F2A (GSG)VKQTLNF DLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID Nº: 179).

[079]Em modalidades específicas, os constructos genéticos incluem uma sequência de sítio interno de entrada no ribossomo (IRES). O IRES pode ser posicionado a montante do VDJ da cadeia pesada do constructo genético. Os IRES são sequências de RNA estruturadas não codificantes que permitem que os ribossomos iniciem a tradução em um segundo sítio interno em uma molécula de mRNA, levando assim à produção de duas proteínas a partir de um mesmo mRNA. No entanto, a tradução orientada por IRES é menos eficaz do que a tradução orientada por 2A, ocasionando assim uma menor expressão da segunda proteína no transcrito.

[080]Em modalidades específicas, os constructos genéticos codificam um ligante flexível entre a porção de cadeia leve do anticorpo selecionado e a porção de cadeia pesada do anticorpo selecionado. Um ligante pode ser uma série de

aminoácidos que liga de maneira flexível um domínio proteico com outro domínio proteico de uma maneira tal que permita que as sequências interligadas interajam para formar uma unidade funcional.

[081]Em modalidades específicas, ligantes flexíveis incluem uma ou mais séries de combinações de glicina e serina, as quais conferem flexibilidade à sequência do ligante. Exemplos de ligantes Gly-Ser incluem (GGS) n (SEQ ID Nº: 180), (GGGS) n (SEQ ID Nº: 181) e (GGGGS) n (SEQ ID Nº: 182), em que $n = 1$ a 100 e cada número inteiro entre esses. Em modalidades específicas, $n = 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29$ ou 30. Em modalidades específicas, um ligante Gly-Ser inclui de 50 a 80 aminoácidos. Em modalidades específicas, um ligante Gly-Ser inclui 54, 57 ou 60 aminoácidos. Em modalidades específicas, o ligante Gly-Ser é codificado pela SEQ ID Nº: 116. Em modalidades específicas, o ligante Gly-Ser inclui a SEQ ID Nº: 122.

[082]Exemplos adicionais de ligantes flexíveis incluem (KESGSVSQLAQFRSLD) n (SEQ ID Nº: 183) e (EGKSSGSGSESKST) n (SEQ ID Nº: 184). Nesses ligantes, os resíduos de Gly e Ser foram projetados para prover flexibilidade, ao passo que Glu e Lys foram adicionados para melhorar a solubilidade. Bird, RE *et al.*, *Science*, 1988; 242:423-426. Em modalidades específicas, $n = 1$ a 100 e todo número inteiro entre eles. Em modalidades específicas, $n = 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29$ ou 30. Em modalidades específicas, esses ligantes incluem de 50 a 80 aminoácidos.

[083]Modalidades específicas incluem uma junção de *splice* que permite o *splicing* entre o RNA codificado pelo constructo genético e o RNA codificado pela região constante de cadeia pesada endógena. Em modalidades específicas, os constructos genéticos incluem uma sequência de junção de *splice* na extremidade 3'. "Splicing" pode referir-se à remoção de íntrons e união de exons por um complexo

RNA/proteína conhecido como *spliceossomo*. Uma "junção de *splice*" refere-se a uma sequência intrônica que flanqueia diretamente um éxon. Uma junção de *splice* na extremidade 3' de um éxon pode incluir um sítio doador de *splice*. As sequências de sítio doador de *splice* tipicamente começam com "GU". Em modalidades específicas, a junção de *splice* pode incluir de 40 a 80 bp de um íntron após o último éxon de um VDJ. Em modalidades específicas, a junção de *splice* inclui de 40 a 80 bp do íntron que flanqueia a extremidade 3' do segmento do gene IGHJ1 humano ou do gene IGHJ3 murídeo. Em modalidades específicas, a junção de *splice* inclui CAG/gtaagt, com o corte e *splice* acontecendo após o G em caixa alta (indicado pela notação "*splice*"). Em modalidades específicas, a junção de *splice* inclui CAG/gtgagt. O CA forma a extremidade de um códon de serina, e no G começa o primeiro códon da região constante. Em modalidades específicas, uma junção de *splice* com uma sequência flankeadora inclui a SEQ ID Nº: 124 ou 151 em constructos genéticos para introdução em um lócus humano. Em modalidades específicas, uma junção de *splice* com uma sequência flankeadora inclui a SEQ ID Nº: 139 em constructos genéticos para a introdução em um lócus murídeo.

[084]Os constructos genéticos revelados neste documento também podem codificar peptídeos de sinal. Exemplos de peptídeos de sinal incluem peptídeos de sinal derivados de cadeias pesadas IgH humanas, tais como MELGLSWIFLLAILKGVQC (SEQ ID Nº: 185); MELGLRWVFLVAILEGVQC (SEQ ID Nº: 186); MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID Nº: 187); MDWTWRILFLVAAATGAHS (SEQ ID Nº: 188); MDWTWRFLFVVAAATGVQS (SEQ ID Nº: 189); MEFGLSWLFLVAILKGVQC (SEQ ID Nº: 190); MEFGLSWVFLVALFRGVQC (SEQ ID Nº: 191); e MDLLHKNMKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID Nº: 192); e peptídeos de sinal derivados de cadeias leves IgL humanas, tais como MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC (SEQ ID Nº: 193); e

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID Nº: 194). Em modalidades específicas, um peptídeo de sinal é codificado pela SEQ ID Nº: 112 e inclui a SEQ ID Nº: 118 em constructos genéticos para introdução em um lócus humano. Em modalidades específicas, um peptídeo de sinal é codificado pela SEQ ID Nº: 129 e inclui a SEQ ID Nº: 134 em constructos genéticos para introdução em um lócus murídeo. Vide também as FIGs. de 25B a 25I e Haryadi R *et al.*, *tPLoS One* v.10(2); 2015, PMC4338144.

[085]Conforme indicado, modalidades específicas da revelação utilizam a introdução de constructos genéticos exógenos em uma localização almejada dentro do genoma endógeno de células B. Em modalidades específicas, essa introdução direcionada pode ser facilitada incluindo-se regiões de homologia em uma ou ambas as extremidades do constructo genético. As regiões de homologia (isto é, suturas de homologia ou braços de homologia) são homólogas às sequências em um sítio de introdução desejado. Em modalidades específicas, "braços de homologia" referem-se a segmentos de DNA incluídos em um constructo genético que são 100% idênticos a uma região de DNA que está sendo modificada. Em modalidades específicas, 100% de identidade podem não ser necessários para obter a introdução direcionada (por exemplo, ao menos 90% de identidade podem bastar).

[086]As regiões de homologia fazem com que o constructo genético alinhe-se próximo à região genética almejada, e as porções de DNA do constructo genético são inseridas na região cortada por técnicas de edição gênica. Em modalidades específicas, um constructo genético pode incluir uma extremidade de homologia de genoma a montante com 20 a 1.500 bp de homologia de genoma e uma extremidade de homologia de genoma a jusante com 20 a 1.500 bp de homologia de genoma. As regiões de homologia podem prover, por exemplo, "suturas de homologia", conforme ilustra a FIG. 15A, os quais podem mediar a introdução do constructo genético no sítio de introdução almejado. Em modalidades específicas, a

extremidade de homologia de genoma a montante e a extremidade de homologia de genoma a jusante podem incluir sequências com homologia em relação a sequências de genoma entre uma região VDJ da cadeia pesada e um elemento intensificador E μ da cadeia pesada. Em modalidades específicas, as regiões de homologia podem incluir particularmente de 20 a 50 pares de bases; de 350 a 550 pares de bases; de 900 a 1.000 pares de bases, ou de 400 a 600 pares de bases. Em modalidades específicas, as regiões de homologia podem incluir particularmente de 30 a 40 pares de bases (por exemplo, 36 pares de bases); de 445 a 455 pares de bases (por exemplo, 450 pares de bases); de 495 a 510 pares de bases (por exemplo, 503 pares de bases); e/ou de 960 a 980 pares de bases (por exemplo, 968 pares de bases). Em modalidades específicas, regiões de homologia para uso em constructos genéticos murídeos incluem as SEQ ID Nº: 90, 91, 96, 97, 127, 140, 142, 143, 170 e 171. Em modalidades específicas, regiões de homologia para uso em constructos genéticos humanos incluem as SEQ ID Nº: 92-95, 98-101, 110, 125, 153, 173 e 174.

[087]Em modalidades específicas, os constructos genéticos também codificam uma sequência de etiqueta. As sequências de etiqueta podem ser úteis, por exemplo, para que as células que expressam o constructo genético sejam identificadas e/ou classificadas durante processos de modificação genética e/ou para que sejam controladas após a administração a um paciente. Por exemplo, em modalidades específicas, pode ser útil rastrear e/ou exterminar células geneticamente modificadas após a administração ao paciente. Exemplos de etiquetas incluem a STREPTAG® (GmbH, LLC, Gottingen, DE), a etiqueta STREP® II (WSHPQFEK (SEQ ID Nº: 195)), ou qualquer variante das mesmas; vide, por exemplo, a Patente dos EUA nº 7.981.632), etiqueta de His, etiqueta Flag (DYKDDDDK (SEQ ID Nº:196)), etiqueta Xpress (DLYDDDDK (SEQ ID Nº: 197)), etiqueta Avi (GLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID Nº: 198)), etiqueta de calmodulina

(KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSLGAL (SEQ ID Nº: 199)), etiqueta de poliglutamato, etiqueta de HA (YPYDVPDYA (SEQ ID Nº: 200)), etiqueta de Myc (EQKLISEEDL (SEQ ID Nº: 201)), etiqueta Nus, etiqueta S, etiqueta de SBP, Softag 1 (SLAELLNAGLGGS (SEQ ID Nº: 202)), Softag 3 (TQDPSRVG (SEQ ID Nº: 203)) e etiqueta V5 (GKPIPPLLGLDST (SEQ ID Nº: 204)).

[088]Em modalidades específicas, a presente invenção propõe um constructo genético para a expressão de anticorpos selecionados que inclui ou codifica (i) um promotor de cadeia pesada, e/ou (ii) uma cadeia leve de imunoglobulina, e/ou (iii) uma região variável de cadeia pesada, e/ou (iv) um códon de parada; e/ou (v) um elemento saltador e/ou (vi) uma junção de *splice* e/ou (vii) braços de homologia e/ou (viii) um ligante e/ou (ix) uma etiqueta.

[089]Modalidades específicas incluem ou codificam: (i) um promotor de cadeia pesada; (ii) um peptídeo de sinal; (iii) uma cadeia leve completa de um anticorpo selecionado; (iv) um ligante flexível ou um elemento saltador; (v) a região variável de uma cadeia pesada do anticorpo selecionado; e (vi) uma junção de *splice*.

[090]Modalidades específicas incluem ou codificam: (i) um promotor de cadeia pesada; (ii) um peptídeo de sinal; (iii) uma cadeia leve completa de um anticorpo selecionado; (iv) um ligante flexível ou um elemento saltador; (v) a região variável de uma cadeia pesada do anticorpo selecionado; (vi) uma junção de *splice*, e (vii) braços de homologia.

[091]Modalidades específicas incluem ou codificam: (i) um promotor de cadeia pesada; (ii) um peptídeo de sinal; (iii) uma cadeia leve completa de um anticorpo selecionado; (iv) um ligante flexível ou um elemento saltador; (v) a região variável de uma cadeia pesada do anticorpo selecionado; (vi) uma junção de *splice*, (vii) braços de homologia; e (viii) uma etiqueta.

[092]A FIG. 15B ilustra exemplos adicionais de modelos de reparo de DNA.

Exemplos de modelos de reparo de DNA que também podem ser usados incluem modelos de DNA sintéticos e vírus adeno-associados. Em modalidades específicas, os modelos de DNA sintéticos podem incluir DNA de fita dupla (dsDNA) que inclui ou codifica um promotor e uma porção do anticorpo selecionado flanqueada por 20 a 1.500 pares de bases de homologia com o sítio alvo no genoma. Em modalidades específicas, os modelos de DNA sintéticos podem incluir DNA de fita única (ssDNA) que inclui ou codifica um promotor e uma porção do anticorpo selecionado flanqueada por 10 a 80 pares de bases ou por 400 a 1.000 pares de bases de homologia com o sítio alvo no genoma. Em modalidades específicas, os modelos de DNA sintéticos podem incluir tanto dsDNA quanto ssDNA, modificados terminalmente por fosforilação para aumentar a eficácia de ligação do DNA. Em modalidades específicas, tanto o dsDNA quanto o ssDNA podem ser modificados terminalmente com ligações de fosforotioato para aumentar a estabilidade e prevenir a digestão da endonuclease.

[093]Em modalidades específicas, um vírus adeno-associado pode incluir um segmento que codifica uma porção de anticorpo sintética flanqueada por 20 a 1.500 pares de bases de homologia com o sítio alvo no genoma. Em modalidades específicas, o promotor e a porção de anticorpo sintética que codificam a sequência podem ser flanqueados por sequências homólogas ao sítio alvo no genoma correspondentes.

[094]Em modalidades específicas, o constructo genético incluindo um mecanismo de reparo de DNA (por exemplo, suturas de homologia, modelo de DNA sintético) pode ser distribuído utilizando um sistema de edição gênica, tal como CRISPR, TALENs, megaTALs, nucleases de dedo de zinco e/ou vírus adeno-associado, conforme descrito em mais detalhe abaixo. Por exemplo, um elemento de direcionamento a genoma, um elemento de corte de genoma e um constructo genético descrito neste documento podem ser administrados a uma célula B.

[095]Como exemplo específico de uma aplicação da presente invenção, as células B podem ser modificadas para expressar o anticorpo palivizumabe. As células B podem ser modificadas com um constructo genético com braços de homologia de 80 bp flanqueando um promotor de cadeia pesada a montante da cadeia leve completa (IgLPV) e os segmentos gênicos VDJ da cadeia pesada (VDJPV) do palivizumabe separados por um peptídeo 2A. Aqui, o peptídeo 2A é incluído a fim de induzir um evento de salto ribossômico (Donnelly *et al.*, *The Journal of general virology*, 2001; 82(Pt 5):1013-25), o que permite que a cadeia pesada e a cadeia leve sejam produzidas como subunidades distintas que se associarão normalmente para formar o anticorpo selecionado. Em modalidades específicas, um códon de parada pode ser incluído a montante do promotor de cadeia pesada introduzido para cessar qualquer transcrição em potencial da região variável da cadeia pesada endógena.

[096]A FIG. 16 ilustra um exemplo de um genoma de célula B “tal como modificado”, ao passo que a FIG. 17 ilustra populações de células B que expressam os anticorpos selecionados resultantes.

[097]Os parágrafos a seguir oferecerão uma descrição detalhada no que se refere a (i) Exemplos de Anticorpos Selecionados e Sequências; (ii) Técnicas de Edição Gênica e Classificação Celular; (iii) Fórmulas de Células B Modificadas; e (iv) Métodos de Uso.

[098](i) Exemplos de Anticorpos Selecionados e Sequências. Em modalidades específicas, um anticorpo selecionado é um anticorpo que pode produzir um efeito protetor contra um patógeno ou condição (por exemplo, doença autoimune). Em modalidades específicas, o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-RSV, um anticorpo anti-HIV, um anticorpo anti-vírus da Dengue, um anticorpo anti-*Bordetella pertussis*, um anticorpo anti-hepatite C, um anticorpo anti-vírus da influenza, um anticorpo anti-vírus da parainfluenza, um anticorpo anti-

metapneumovírus (MPV), um anticorpo anti-citomegalovírus, um anticorpo anti-vírus Epstein Barr; um anticorpo anti-herpes-vírus simples, um anticorpo anti-toxina bacteriana do *Clostridium difficile* ou um anticorpo anti-fator de necrose tumoral (TNF).

[099]Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados são anticorpos quiméricos. Em modalidades específicas, "anticorpos quiméricos" referem-se a um anticorpo sintético que inclui: (i) ao menos uma porção que é codificada por um genoma de célula B endógeno e (ii) ao menos uma porção que é codificada por um constructo genético introduzido. Em modalidades específicas, o anticorpo químérico inclui um domínio constante de cadeia pesada endógeno, uma cadeia leve variável e constante de imunoglobulina exógena, e uma cadeia pesada variável exógena.

[0100]Os anticorpos e sequências a seguir são úteis para obter anticorpos selecionados com ligação direcionada contra patógenos ou antígenos de interesse (salvo menção em contrário, a numeração de Kabat é tencionada):

[0101]Um exemplo de anticorpo anti-RSV é o palivizumabe, que mira a proteína de fusão do RSV e é usado para prevenir ou reduzir infecções pelo RSV.

[0102]Em modalidades específicas, um anticorpo anti-RSV é o palivizumabe murídeo, que inclui uma sequência de cadeia pesada variável que inclui:

QVELQESGPGILQPSQLTCSFGSLSTGMSVGWIRQPSGEGLEWL
ADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITGVDTADTATYYCARSMTNWYF
DVWGAGTTTVSS (SEQ ID Nº: 138); e uma sequência de cadeia leve variável que inclui:

DIQLTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSSGYMHWYQQKLSTSPKLQIYDTS
KLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSIQAEDVATYYCFRGSGYPFTFGQQGTKLEIK
(SEQ ID Nº: 205).

[0103]Um exemplo adicional de anticorpo anti-RSV é o palivizumabe

humano e inclui uma sequência de cadeia leve variável que inclui:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTS
KLASGVPSRSGSGTEFTLTSSLQPDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKLEIKR
(SEQ ID Nº: 206); e uma sequência de cadeia pesada variável que inclui:

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTGMSVGWIRQPPGKALEWLA
DIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNWYF
DVWGAGTT (SEQ ID Nº: 123).

[0104] Dentro de uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável, segmentos chamados de regiões determinantes de complementaridade (CDRs) ditam a ligação com o epítopo. Cada cadeia pesada possui três CDRs (ou seja, CDRH1, CDRH2 e CDRH3) e cada cadeia leve possui três CDRs (ou seja, CDRL1, CDRL2 e CDRL3).

[0105] Um exemplo adicional de anticorpo anti-RSV é descrito na Patente dos EUA nº 9.403.900. Esse anticorpo anti-RSV inclui uma cadeia pesada variável com uma sequência de CDRH1 que inclui GASINSDNYYWT (SEQ ID Nº: 207), uma sequência de CDRH2 que inclui HISYTGNYYTPSLKS (SEQ ID Nº: 208) e uma sequência de CDRH3 que inclui CGAYVLISNCGWFD (SEQ ID Nº: 209); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui QASQDISTYLN (SEQ ID Nº: 210), uma sequência de CDRL2 que inclui GASNLET (SEQ ID Nº: 211) e uma sequência de CDRL3 que inclui QQYQYLPYT (SEQ ID Nº: 212).

[0106] Exemplos de anticorpos anti-RSV também incluem AB1128 (disponibilizado pela MILLIPORE) e ab20745 (disponibilizado pela ABCAM).

[0107] Um exemplo de um anticorpo anti-HIV é o 10E8, que é um anticorpo amplamente neutralizante que liga-se a gp41. O anticorpo anti-HIV 10E8 inclui uma cadeia variável pesada com uma sequência de CDRH1 que inclui GFDFDNAW (SEQ ID Nº: 213), uma sequência de CDRH2 que inclui ITGPGEWGSV (SEQ ID Nº: 214) e uma sequência de CDRH3 que inclui TGKYYDFWSGYPPGEYFQD (SEQ ID

Nº: 215); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui TGDSLRSHYAS (SEQ ID Nº: 216), uma sequência de CDRL2 que inclui GKNNRPS (SEQ ID Nº: 217) e uma sequência de CDRL3 que inclui SSRDKSGSRLSV (SEQ ID Nº: 218).

[0108]Um exemplo adicional de um anticorpo anti-HIV é o VRC01, que é um anticorpo amplamente neutralizante que liga-se ao sítio de ligação CD4 de gp120. O anticorpo VRC01 inclui uma cadeia pesada variável com uma sequência de CDRH1 que inclui GYEFIDCT (SEQ ID Nº: 219), uma sequência de CDRH2 que inclui KPRGGAVN (SEQ ID Nº: 220) e uma sequência de CDRH3 que inclui RGKNCDYNWDFEHW (SEQ ID Nº: 221); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui QYGS, uma sequência de CDRL2 que inclui SGS e uma sequência de CDRL3 que inclui QQYEF (SEQ ID Nº: 222).

[0109]Exemplos de anticorpos anti-HIV também incluem ab18633 e 39/5.4A (disponibilizados pela ABCAM); e H81E (disponibilizado pela THERMOFISHER).

[0110]Um exemplo de um anticorpo anti-vírus da Dengue é o anticorpo 55 descrito na U.S. 20170233460 e inclui uma cadeia pesada variável com uma sequência de CDRH1 que inclui EVQLHQSGAELVKPGASVQLSCTVSGFNIK (SEQ ID Nº: 223), uma sequência de CDRH2 que inclui WVKQRPEQGLEWI (SEQ ID Nº: 224) e uma sequência de CDRH3 que inclui ATIKADTSSNTAYLQLISLTSEDTAVYYCAF (SEQ ID Nº: 225); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui DIQMTQSPASLSVGETVTITC (SEQ ID Nº: 226), uma sequência de CDRL2 que inclui WYQQKQGKSPQLLVY (SEQ ID Nº: 227) e uma sequência de CDRL3 que inclui GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYC (SEQ ID Nº: 228).

[0111]Um exemplo adicional de um anticorpo de anti-vírus da Dengue é o DB2-3 descrito na Patente dos EUA nº 8.637.035 e inclui uma cadeia pesada variável com uma sequência de CDRH1 que inclui YTFTDYAIT (SEQ ID Nº: 229),

uma sequência de CDRH2 que inclui GLISTYYGDSFYNQKFKG (SEQ ID Nº: 230) e uma sequência de CDRH3 que inclui TIRDGKAMDY (SEQ ID Nº: 231); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui RSSQLVHSNGNTYLH (SEQ ID Nº: 232), uma sequência de CDRL2 que inclui KVSNRFS (SEQ ID Nº: 233) e uma sequência de CDRL3 que inclui SQSTHVPYT (SEQ ID Nº: 234). Exemplos de anticorpos anti-vírus da Dengue também incluem ab155042 e ab80914 (ambos disponibilizados pela ABCAM).

[0112]Um exemplo de um anticorpo anti-coqueluche é descrito na Patente dos EUA nº 9.512.204 e inclui uma cadeia pesada variável que inclui QVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYKFTS

YWMHWVKQRPGQGLEWIGNIFPGSGSTNYDEKFNSKATLTVDTSSNTAYMQLSSL
TSEDSAVYYCTRWLSGAYFDYWGQQGTTVTVSS (SEQ ID Nº: 235) e uma cadeia leve variável que inclui QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVFMYWYQQKPRSSPKPWIYLNLSG
VPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSHPTFGSGTKLEIK (SEQ ID Nº: 236).

[0113]Um exemplo de um anticorpo anti-hepatite C inclui uma cadeia pesada variável com uma sequência de CDRH1 que inclui SYGMHW (SEQ ID Nº: 237), uma sequência de CDRH2 que inclui VIWLDGSNTYYADSVKGR (SEQ ID Nº: 238) e uma sequência de CDRH3 que inclui ARDIFTVARGVIIYFDY (SEQ ID Nº: 239); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui RASQSVSSYLA (SEQ ID Nº: 240), uma sequência de CDRL2 que inclui DASN RAT (SEQ ID Nº: 241) e uma sequência de CDRL3 que inclui QQRSNWVT (SEQ ID Nº: 242). Exemplos de anticorpos anti-hepatite C também incluem MAB8694 (disponibilizado pela MILLIPORE) e C7-50 (disponibilizado pela ABCAM).

[0114]Um exemplo de anticorpo anti-vírus da influenza é descrito na Patente dos EUA nº 9.469.685 e inclui uma cadeia pesada variável com uma sequência de

CDRH1 que inclui GMTSNSLA (SEQ ID Nº: 243), uma sequência de CDRH2 que inclui IIPVFETP (SEQ ID Nº: 244) e uma sequência de CDRH3 que inclui ATSAGGIVNYYLSFNI (SEQ ID Nº: 245); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui QTITTW (SEQ ID Nº: 246), uma sequência de CDRL2 que inclui KTS e uma sequência de CDRL3 que inclui QQYSTYSGT (SEQ ID Nº: 247). Um exemplo de um anticorpo anti-vírus da influenza também inclui C102 (disponibilizado pela THERMOFISHER).

[0115]Um exemplo de anticorpo anti-MPV inclui o MPE8.

[0116]Exemplos de anticorpos anti-CMV incluem MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 e LJP539. O RG7667 inclui uma mistura de MCMV5322A e MCMV3068A, ao passo que CSJ148 inclui uma mistura de LJP538 e LJP539. Vide também, por exemplo, Deng *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(2), e01108-17 (fevereiro de 2018); e Dole *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(5), 2881-2887 (maio de 2016).

[0117]Um exemplo de um anticorpo anti-EBV inclui uma cadeia pesada variável com uma sequência de CDRH1 do AMM01 que inclui YTFIHFGISW (SEQ ID Nº: 248), uma sequência de CDRH2 do AMM01 que inclui IDTNNGNTNYAQSLQG (SEQ ID Nº: 249) e uma sequência de CDRH3 do AMM01 que inclui RALEMGHRSGFPFDY (SEQ ID Nº: 250); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 do AMM01 que inclui GGHNIGAKNVH (SEQ ID Nº: 251), uma sequência de CDRL2 do AMM01 que inclui YDSDRPS (SEQ ID Nº: 252) e uma sequência de CDRL3 do AMM01 que inclui CQVWDSSGRGHPLYV (SEQ ID Nº: 253).

[0118]Um exemplo de um anticorpo anti-HSV que inclui HSV8-N e MB66.

[0119]Exemplos de anticorpos anti-*Clostridium difficile* incluem o actoxumabe e o bezlotoxumabe. Vide também, por exemplo, Wilcox *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 376(4), 305-317 (2017).

[0120]Anticorpos anti-TNF disponíveis na praça incluem o infliximabe

(Remicade® Centocor, Inc., Malvern, PA com biossimilares Inflectra® Pfizer, Kent, Reino Unido e Ixifi® Pfizer, Nova York, NY), adalimumabe (Humira® Abbott Laboratories, Abbott Park, IL com biossimilares Amjevita® Amgen, Thousand Oaks, CA e Cyltezo® Boehringer Ingelheim Int'l, Ingelheim, DE), golimumabe (Simponi® Johnson & Johnson Corp., New Brunswick, NJ), etanercepte (Enbrel ® Immunex Corp, Thousand Oaks, CA com biossimilar Erelzi® Novartis AG, Basel, CH) e certolizumabe-pegol (Cimzia® UCB Pharma, Bruxelas, BE).

[0121]Em modalidades específicas, as CDRs do infliximabe incluem: os resíduos de cadeia pesada 26-37, 52-70 e 103-116 e os resíduos de cadeia leve 24-39, 55-61 e 94-102. Em modalidades específicas, a cadeia pesada do infliximabe começa com EVKLEESGGGLVQPGGSMK (SEQ ID Nº: 254) e a cadeia leve começa com DILLTQSPAIALSVSPGER (SEQ ID Nº: 255).

[0122]Em modalidades específicas, o infliximabe inclui uma cadeia pesada variável com uma sequência de CDRH1 que inclui IFSNHW (SEQ ID Nº: 256), uma sequência de CDRH2 que inclui RSKSINSATH (SEQ ID Nº: 257) e uma sequência de CDRH3 que inclui NYYGSTY (SEQ ID Nº: 258); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui FVGSSIH (SEQ ID Nº: 259), uma sequência de CDRL2 que inclui KYASESM (SEQ ID Nº: 260) e uma sequência de CDRL3 que inclui QSHSW (SEQ ID Nº: 261).

[0123]Em modalidades específicas, o adalimumabe inclui uma cadeia pesada variável com uma sequência de CDRH1 que inclui TFDDYA (SEQ ID Nº: 262), uma sequência de CDRH2 que inclui TWNSGHID (SEQ ID Nº: 263) e uma sequência de CDRH3 que inclui VSYLSTASSL (SEQ ID Nº: 264); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui GIRNYLA (SEQ ID Nº: 265), uma sequência de CDRL2 que inclui YAASTLQ (SEQ ID Nº: 266) e uma sequência de CDRL3 que inclui RYNRA (SEQ ID Nº: 267).

[0124]Em modalidades específicas, o certolizumabe inclui uma cadeia

pesada variável com uma sequência de CDRH1 que inclui VFTDYG (SEQ ID Nº: 268), uma sequência de CDRH2 que inclui NTYIGEPI (SEQ ID Nº: 269) e uma sequência de CDRH3 que inclui GYRSYAM (SEQ ID Nº: 270); e uma cadeia leve variável com uma sequência de CDRL1 que inclui NVGTNVA (SEQ ID Nº: 271), uma sequência de CDRL2 que inclui YSASFLY (SEQ ID Nº: 272) e uma sequência de CDRL3 que inclui QYNIY (SEQ ID Nº: 273).

[0125]Várias sequências de anticorpos adicionais que podem ser usadas nos ensinamentos da presente invenção encontram-se disponíveis e são conhecidas pelos versados na técnica . Informações de sequência para anticorpos disponíveis na praça podem ser encontradas no banco de dados DrugBank, no Registro CAS e/ou no Banco de Dados de Proteínas RCSB. Além disso, sequências de ácido nucleico que codificam porções de anticorpos selecionados descritos neste documento podem ser facilmente deduzidas pelos versados na técnica.

[0126](ii) Técnicas de Edição Gênica e Classificação Celular. Sistemas de edição gênica permitem o controle sobre os sítios alvo das terapias genéticas. Nos ensinamentos da presente invenção, qualquer sistema de edição gênica capaz do direcionamento e modificação de sequência precisos pode ser usado. Esses sistemas incluem tipicamente um elemento de direcionamento para o direcionamento preciso e um elemento de corte para cortar o sítio genético almejado. O RNA guia é um exemplo de um elemento de direcionamento, ao passo que várias nucleases servem como exemplo de elementos de corte. Elementos de direcionamento e elementos de corte podem ser moléculas distintas ou interligados, por exemplo, por uma nanopartícula. Como alternativa, um elemento de direcionamento e um elemento de corte podem ser interligados em uma molécula de dupla finalidade. Quando a introdução de um ácido nucleico terapêutico é tencionada, os sistemas também podem incluir modelos de reparo dirigido por homologia (isto é, braços de homologia conforme descritos acima) associados ao

constructo genético. Todavia, conforme descrito em mais detalhes abaixo, sistemas de edição gênica diferentes podem adotar componentes e configurações diferentes, ao passo que mantêm a capacidade de mirar, cortar e modificar com precisão sítios genômicos selecionados.

[0127]Modalidades específicas utilizam nucleases de dedo de zinco (ZFNs) como agentes de edição gênica. As ZFNs são uma classe de nucleases específicas de sítio projetadas para ligar-se ao DNA e clivá-lo em posições específicas. As ZFNs são usadas para introduzir quebras de fita dupla (DSBs) em um sítio específico em uma sequência de DNA que permite que as ZFNs mirem sequências específicas dentro de um genoma em uma variedade de células diferentes. Além disso, subsequentemente à quebra de fita dupla, o reparo dirigido por homologia (HDR) ou a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ocorrem para reparar a DSB, permitindo assim a edição do genoma.

[0128]As ZFNs são sintetizadas fusionando um domínio de ligação com DNA de dedo de zinco e um domínio de clivagem de DNA. O domínio de ligação com DNA inclui de três a seis proteínas de dedo de zinco que são fatores de transcrição. O domínio de clivagem de DNA inclui o domínio catalítico, por exemplo, da FokI endonuclease. O domínio FokI atua como um dímero que requer dois constructos com domínios de ligação com DNA específicos para sítios na sequência alvo. O domínio de clivagem de FokI cliva dentro de uma sequência espaçadora de cinco ou seis pares de bases separando os dois meio-sítios invertidos.

[0129]Para mais informações acerca das ZFNs, vide Kim, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1156-1160 (1996); Wolfe, *et al.*, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29, 183-212 (2000); Bibikova, *et al.*, *Science* 300, 764 (2003); Bibikova, *et al.*, *Genetics* 161, 1169-1175 (2002); Miller, *et al.*, *The EMBO journal* 4, 1609-1614 (1985); e Miller, *et al.*, *Nature biotechnology* 25, 778-785 (2007).

[0130]Modalidades específicas podem usar nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) como agentes de edição gênica. As TALENs referem-se a proteínas de fusão que incluem um efetor semelhante a ativadores de transcrição (TALE), uma proteína de ligação com DNA e um domínio de clivagem de DNA. As TALENs são usadas para editar genes e genomas ao induzir a DSBs no DNA, o que provoca mecanismos de reparo nas células. Em termos gerais, duas TALENs devem ligar-se a e flanquear cada lado do sítio de DNA alvo para que o domínio de clivagem de DNA dimerize e induza a uma DSB. A DSB é reparada na célula por NHEJ ou HDR se um fragmento de DNA doador de fita dupla exógeno se fizer presente.

[0131]Conforme indicado, as TALENs foram desenvolvidas para ligar-se a uma sequência alvo, por exemplo, de um genoma endógeno e cortar o DNA na localização da sequência alvo. Os TALEs das TALENs são proteínas de ligação com DNA secretadas por bactérias do gênero *Xanthomonas*. O domínio de ligação com DNA dos TALEs incluem uma repetição de 33 ou 34 aminoácidos altamente conservada, com resíduos divergentes nas posições 12^a e 13^a de cada repetição. Essas duas posições, chamadas de Birresíduo Variável Repetido (RVD), exibem forte correlação com reconhecimento de nucleotídeos específicos. Logo, a especificidade de direcionamento pode ser aprimorada trocando os aminoácidos no RVD e incorporando aminoácidos de RVD não convencionais.

[0132]Exemplos de domínios de clivagem de DNA que podem ser usados em fusões de TALEN são FokI endonucleases do tipo selvagem e variantes. Para mais informações acerca das TALENs, vide Boch, *et al.*, *Science* 326, 1509-1512 (2009); Moscou, & Bogdanove, *Science* 326, 1501 (2009); Christian, *et al.*, *Genetics* 186, 757-761 (2010); e Miller, *et al.*, *Nature biotechnology* 29, 143-148 (2011).

[0133]Modalidades específicas utilizam MegaTALs como agentes de edição gênica. As MegaTALs têm uma estrutura de nuclease de clivagem rara de cadeia

única em que um TALE é fusionado ao domínio de clivagem de DNA de uma meganuclease. As meganucleases, também conhecidas como endonucleases *homing*, são cadeias peptídicas simples que compreendem tanto o reconhecimento de DNA quanto a função da nuclease no mesmo domínio. À diferença da TALEN, a megaTAL só requer a distribuição de uma única cadeia peptídica para garantir uma atividade funcional.

[0134]Em modalidades específicas, o genoma de célula B endógeno pode ser mirado usando sistemas de edição gênica CRISPR. O sistema de nuclease CRISPR é um sistema imunológico procarionte que confere resistência a elementos genéticos estranhos, tais como plasmídeos e fagos, e proporciona uma forma de imunidade adquirida. As CRISPRs são lócus de DNA que contêm repetições curtas de sequências de bases. No contexto de um sistema imunológico procarionte, cada repetição é seguida por segmentos curtos de DNA espaçador pertencentes a elementos genéticos estranhos a que o procarionte se expõe. O arranjo CRISPR de repetições intercaladas com espaçadores pode ser transcrito no RNA. O RNA pode ser processado em uma forma madura e associado a uma nuclease, tal como a cas nuclease (associada a (CRISPR)). Um sistema CRISPR-Cas incluindo um RNA com uma sequência capaz de hibridizar nos elementos genéticos estranhos e a Cas nuclease pode então reconhecer e cortar esses elementos genéticos exógenos no genoma.

[0135]Um sistema CRISPR-Cas não requer a geração de proteínas personalizadas para mirar sequências específicas, mas, em vez disso, uma única enzima Cas pode ser programada por uma molécula de RNA guia curto (crRNA) para reconhecer um alvo de DNA específico. Os sistemas CRISPR-Cas de imunidade adaptativa bacteriana e arquitetônica exibem extrema diversidade de composição proteica e arquitetura dos lócus genômicos. Os lócus do sistema CRISPR-Cas têm mais de 50 famílias de genes e não há genes estritamente

universais, indicando a rápida evolução e extrema diversidade da arquitetura dos lócus. Até hoje, adotando-se uma abordagem em várias frentes, há uma identificação de genes da cas abrangente de 395 perfis para 93 proteínas Cas. A classificação inclui perfis gênicos característicos, além arquiteturas de lócus características. Uma nova classificação dos sistemas CRISPR-Cas é proposta, na qual esses sistemas são amplamente divididos em duas classes: Classe 1 com complexos efetores multi-subunidade e Classe 2 com módulos efetores mono-subunidade exemplificados pela proteína Cas9.

[0136]Ao menos três Cas9 nucleases diferentes foram desenvolvidas para a edição de genomas. A primeira é a Cas9 do tipo selvagem, que introduz quebras de ligação dupla (DSBs) em um sítio de DNA específico, resultando assim na ativação do maquinário de reparo de DSB. As DSBs podem ser reparadas por junção de extremidades não homólogas (NHEJ), reparo dirigido por homologia (HDR) ou reparo mediado por micro-homologia (MMEJ). A NHEJ pode envolver o reparo de uma DSB sem homologia (<5 bp) entre as duas extremidades unidas durante o reparo; o HDR pode envolver o reparo de uma DSB com uma grande região de homologia entre as extremidades unidas durante o reparo (100 ou mais nucleotídeos); e a MMEJ pode envolver o reparo de uma DSB com uma pequena região (5 a 50 bp) de homologia entre as extremidades unidas durante o reparo. Outro tipo de Cas9 inclui uma Cas9 mutante, conhecida como Cas9D10A, somente com atividade nickase, o que significa que ela só cliva uma fita de DNA e não ativa a NHEJ. Sendo assim, os reparos ao DNA prosseguem tão somente através da via do HDR. A terceira é uma Cas9 (dCas9) deficiente em nuclease que não possui atividade de clivagem mas é capaz de ligar-se ao DNA. Logo, a dCas9 é capaz de mirar sequências específicas de um genoma sem clivagem. Ao fusionar a dCas9 com vários domínios efetores, ela pode ser usada como uma ferramenta de silenciamento ou ativação de genes.

[0137]Além dos sistemas CRISPR-Cas de Classe 1 e Classe 2, mais recentemente uma CRISPR-Cas Classe 2 Tipo V exemplificada por Cpf1 foi identificada por Zetsche *et al.* (2015) *Cell* 163(3): 759-771. A Cpf1 nuclease pode prover particularmente maior flexibilidade na seleção do sítio alvo por meio de uma sequência de reconhecimento curta de três bases de base (TTN), conhecida como motivo adjacente ao protoespaçador ou PAM. O sítio de corte da Cpf1 fica a pelo menos 18 bp de distância da sequência do PAM, logo a enzima pode cortar repetidamente um lócus específico após a formação da indel (introdução e deleção), aumentando assim a eficiência do HDR. Além disso, DSBs escalonadas com extremidades pegajosas permitem a introdução de um modelo doador específico à orientação.

[0138]Mais informações acerca de sistemas CRISPR-Cas e componentes dos mesmos são descritas na US8697359, US8771945, US8795965, US8865406, US8871445, US8889356, US8889418, US8895308, US8906616, US8932814, US8945839, US8993233 e US8999641 e em pedidos relacionados às mesmas; e na WO2014/018423, WO2014/093595, WO2014/093622, WO2014/093635, WO2014/093655, WO2014/093661, WO2014/093694, WO2014/093701, WO2014/093709, WO2014/093712, WO2014/093718, WO2014/145599, WO2014/204723, WO2014/204724, WO2014/204725, WO2014/204726, WO2014/204727, WO2014/204728, WO2014/204729, WO2015/065964, WO2015/089351, WO2015/089354, WO2015/089364, WO2015/089419, WO2015/089427, WO2015/089462, WO2015/089465, WO2015/089473 and WO2015/089486, WO2016205711, WO2017/106657, WO2017/127807 e em pedidos relacionados às mesmas.

[0139]Modalidades específicas combinam o tracrRNA e o crRNA em um único RNA guia sintético (sgRNA utilizando, por exemplo, a SEQ ID Nº: 87-89 ou 290-366). Em modalidades específicas, um sgRNA pode incluir uma sequência de

vinte nucleotídeos que é análoga ao crRNA, e uma sequência de tracrRNA. Para certos sistemas de edição gênica, a sequência alvo pode ser adjacente a um PAM (por exemplo, 5'-20nt alvo - NGG-3'). Em modalidades específicas, uma sequência alvo pode incluir um PAM (SEQ ID Nº: 5-84). Em modalidades alvo, o RNA guia (gRNA) inclui um sítio alvo adjacente ao PAM mirado pelo complexo de edição gênica de genoma. O gRNA pode incluir ao menos os 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 nucleotídeos adjacentes ao PAM.

[0140]Em modalidades específicas, um elemento de corte é direcionado a uma localização de DNA almejada com a assistência de gRNAs desenvolvidos (FIG. 25A (*Sternberg et al., Mol Cell.*, 2015; 58(4):568-74)). Constructos genéticos com braços de homologia flanqueando a região genômica cortada são introduzidos com eficiência nessa localização pelo mecanismo de reparo de DNA dirigido por homologia (vide, por exemplo, a FIG. 15B (*Elliott et al., Mol Cell Biol.*, 1998; 18(1):93-101). Usando essa abordagem, a expressão do anticorpo endógeno será eliminada e os genes que codificam o anticorpo selecionado serão introduzidos na localização genética tencionada. Essa introdução direcionada elimina ou reduz significativamente o risco de efeitos fora do alvo decorrentes da introdução genética aleatória.

[0141]Em modalidades específicas, o sgRNA que mira a IgH murídea ou humana de cada anticorpo endógeno mira a região de 100 bp a jusante da região J (FIG. 9). Nos exemplos experimentais, essa região foi mirada para expressar uma versão do anticorpo selecionado palivizumabe contendo a região C do genoma endógeno (FIGs. 7 e 9). O algoritmo da crispr.mit.edu (Hsu *et al., Nat Biotechnol.*, 2013; 31(9):827-32) identificou 22 sequências de direcionamento para essa região previstas para ter pouca ligação fora do alvo, se alguma. Sequências de direcionamento individuais podem ser inseridas no sgRNA de comprimento total e misturadas a uma nuclease, tal como a Cas9, imediatamente antes da incubação,

conforme descrito (Schumann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015; 112(33):10437-42), e eletroporadas em células B (Kim *et al.*, *J. Immunol.*, 1979; 122(2):549-54). Visto que o reparo celular do DNA cortado pela Cas9 geralmente resulta em perda da função gênica (Symington & Gautier, *Annu. Rev. Genet.*, 2011; 45:247-71), espera-se que sgRNAs eficientes mirando regiões codificantes de anticorpo resultem no surgimento de algumas células B com carência de anticorpos, que podem ser facilmente avaliadas por citometria de fluxo. A atividade dos sgRNAs mirando sequências intrônicas pode ser avaliada por sequenciamento, ou através de ensaios enzimáticos tais como o ensaio da T7 endonuclease.

[0142]Em modalidades específicas, os elementos de direcionamento e corte de genoma podem ser administrados por eletroporação, distribuição mediada por nanopartículas e/ou distribuição de vetor viral. A eletroporação pode ser útil, por exemplo, para distribuir elementos de direcionamento e/ou elementos de corte porque a membrana da célula normalmente não permite que essas moléculas estranhas entrem na célula. A eletroporação envia um choque elétrico às células, o que permite temporariamente que essas moléculas estranhas atravessem a membrana celular.

[0143]Em modalidades específicas, os constructos genéticos para introdução podem ser administrados por eletroporação, distribuição mediada por nanopartículas e/ou distribuição de vetor viral. Vetores virais adeno-associados incluem os derivados, por exemplo, do adenovírus 5 (Ad5), adenovírus 35 (Ad35), adenovírus 11 (Ad11), adenovírus 26 (Ad26), adenovírus 48 (Ad48) ou adenovírus 50 (Ad50)), e vírus adeno-associado (AAV; vide, por exemplo, a Patente dos EUA nº 5.604.090; Kay *et al.*, *Nat. Genet.*, 24:257 (2000); Nakai *et al.*, *Blood* 91:4600 (1998)).

[0144]Em modalidades específicas, os elementos de direcionamento e corte de genoma podem ser administrados por eletroporação, e constructos genéticos

para introdução podem ser administrados por distribuição mediada por AAV. Em modalidades específicas, os elementos de direcionamento e corte de genoma podem ser administrados por distribuição mediada por nanopartículas, e os constructos genéticos para introdução podem ser administrados por distribuição mediada por AAV.

[0145]Em modalidades específicas, o constructo genético incluindo um transgene pode ser misturado a um elemento de direcionamento (por exemplo, sgRNA) e a um elemento de corte (por exemplo, Cas9 ou cpf1) imediata ou brevemente antes da eletroporação. A expressão do anticorpo selecionado pode ser confirmada mais tarde (por exemplo, 3 dias depois) medindo-se a ligação celular com proteínas alvo fluorescentemente marcadas por citometria de fluxo. Metodologias de enriquecimento e análise para detectar e analisar células B específicas do epítopo podem ser adotadas. Pape *et al.*, *Science*, 2011; 331(6021):1203-7; Taylor *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2012; 209(3):597-606; Taylor *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2012; 209(11):2065-77; Haasken *et al.*, *J. Immunol.* 2013; 191(3):1055-62; Taylor *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 2014; 405:74-86; Nanton *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 2015; 45(2):428-41; Hamilton *et al.*, *J. Immunol.*, 2015; 194(10):5022-34; Taylor *et al.*, *Science*, 2015; 347(6223):784-7). Essas metodologias permitem a detecção de células B que expressam o anticorpo selecionado em frequências tão extraordinariamente baixas quanto 0,00002% de toda a população de células B (Taylor *et al.*, *Science*, 2015; 347(6223):784-7).

[0146]Em modalidades específicas, as células podem ser identificadas e/ou classificadas com base na expressão do marcador, antes ou depois de distribuir o constructo genético. Por exemplo, pode ser útil isolar um tipo específico de células B (por exemplo, células B de memória, células B secretoras de anticorpos, células B virgens, células B B1, células B da zona marginal) de uma amostra antes de distribuir o constructo genético. Em outro exemplo, pode ser útil isolar células B de

outras células presentes em uma amostra de sangue. A CD19 é um exemplo de uma proteína expressa pelas células B mas por poucas outras células do corpo. Ao marcar a CD19 com uma molécula fluorescente, as células B podem ser especificamente identificadas. A B220 é um marcador útil para identificar células B murídeas.

[0147]A CD27 é um exemplo de uma proteína expressa por células B de memória humanas mas não por células B virgens humanas. Ao marcar a CD27 com uma molécula fluorescente, as células B de memória podem ser identificadas.

[0148]A CD21 é um exemplo de uma proteína não expressa (ou expressa em baixo grau) por algumas células B de memória humanas com capacidade de secretar anticorpos rapidamente após uma infecção. A baixa expressão da CD21 pode ser usada para definir células B iniciadas para a diferenciação celular no plasma. Ao marcar a CD21 com uma molécula fluorescente, essas células B podem ser identificadas especificamente, por exemplo, por seleção negativa.

[0149]Células B virgens humanas podem ser identificadas pelo perfil de marcador IgM+ IgD+ CD27-. Células B virgens murídeas podem ser identificadas pelo perfil de marcador CD38+ GL7- IgM+ IgD+. Células B B1 humanas podem ser identificadas pelo perfil de marcador CD5+ CD43+. Células B B1 murídeas podem ser identificados pelo perfil de marcador CD43+ B220LOW. Células B da zona marginal humanas podem ser identificadas pelo perfil de marcador CD21+++ IgM++ IgD- CD27+. Células B da zona marginal murídeas podem ser identificadas pelo perfil de marcador CD21+++ IgM++ IgD-.

[0150]Modalidades específicas podem utilizar o perfil de marcador CD19⁺CD27⁺CD21^{lo}.

[0151]A CD45 é um marcador usado para identificar e/ou isolar tipos celulares usados nos experimentos descritos neste documento. Diferentes linhagens murídeas expressam diferentes versões da proteína chamada de CD45,

denominadas CD45.1 e CD45.2. Em experimentos revelados neste documento, células B de um camundongo que expressa a CD45.2 são coletadas e transferidas a um camundongo que expressa a CD45.1. Ao marcar a CD45.1 e a CD45.2 com moléculas fluorescentes diferentes, é possível identificar as células que advêm do animal doador porque elas expressam a CD45.2 mas não a CD45.1.

[0152]Modalidades específicas incluem classificar as células B após a modificação genética com base na expressão de uma cadeia leve exógena. Por exemplo, células B que expressam naturalmente uma cadeia leve kappa podem ser modificadas para expressar um anticorpo selecionado que inclui uma cadeia leve lambda. Células B que expressam naturalmente uma cadeia leve lambda podem ser modificadas pra expressar um anticorpo selecionado que inclui uma cadeia leve kappa. A classificação com base na expressão de uma cadeia leve exógena permitirá o isolamento somente das células B que expressam o anticorpo selecionado. Em modalidades específicas, só as células B que carecem completamente da expressão de sua cadeia leve endógena na superfície são isoladas para formulação e administração a um paciente.

[0153]Em modalidades específicas, as células podem ser identificadas e/ou isoladas usando citometria de fluxo. A citometria de fluxo é uma abordagem de análise sensível e poderosa que utiliza *lasers* para analisar individualmente as moléculas fluorescentes marcando milhões de células individuais. Ao analisar a combinação de moléculas fluorescentes com que cada célula é marcada, diferentes subtipos de células B podem ser identificados. A citometria de fluxo pode ser usada para identificar subconjuntos de células B e analisar a expressão de anticorpos selecionados (por exemplo, palivizumabe) dentro dessas células.

[0154]Em modalidades específicas, métodos para modificar células B podem incluir obter células-tronco hematopoiéticas (HSC) e/ou distribuir os constructos genéticos a HSC. "HSC" pode referir-se a um tipo de célula-tronco que produz

naturalmente células B, bem como outras células do sistema imunológico. As HSC podem ser obtidas, por exemplo, do sangue do cordão umbilical.

[0155]Resultados experimentais específicos descritos neste documento utilizaram células A20 para desenvolver a metodologia de modificação genética antes de passar para células B recém-isoladas. A A20 é uma linha celular imortalizada composta por uma célula B murídea.

[0156]Em modalidades específicas, células B podem ser obtidas de um paciente humano, e as células B obtidas ou um subconjunto das mesmas pode ser modificado *ex vivo*.

[0157]Fórmulas de Células B Modificadas. Uma vez modificadas, as células podem ser coletadas de um meio de cultura e lavadas e concentradas em um veículo em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Exemplos de veículos incluem solução salina, solução salina tamponada, soro fisiológico, água, solução de Hanks, solução de Ringer, Nonnosol-R (Abbott Labs), PLASMA-LYTE A® (Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, IL), glicerol, etanol, e combinações desses.

[0158]Em modalidades específicas, os veículos podem ser suplementados com albumina do soro humano (HSA) ou outros componentes do soro humano ou soro fetal bovino. Em modalidades específicas, um veículo para infusão inclui solução salina tamponada com 5% de sal sódico de ácido hialurônico (HAS) ou dextrose. Agentes isotônicos adicionais incluem álcoois de açúcar polihídricos, inclusive álcoois de açúcar trihídricos ou superiores, tais como glicerina, eritritol, arabinol, xilitol, sorbitol ou manitol.

[0159]Os veículos podem incluir agentes tamponantes, tais como tampões de citrato, tampões de succinato, tampões de tartrato, tampões de fumarato, tampões de gliconato, tampões de oxalato, tampões de lactato, tampões de acetato, tampões de fosfato, tampões de histidina, e/ou sais de trimetilamina.

[0160]"Estabilizantes" referem-se a uma vasta categoria de excipientes que

podem variar quanto à função desde um agente de volume a um aditivo que ajuda a prevenir a aderência das células às paredes de um recipiente. Estabilizantes típicos podem incluir sais de açúcar polihídricos; aminoácidos tais como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutâmico e treonina; açúcares orgânicos ou álcoois de açúcar, tais como lactose, trehalose, estaquiose, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioínisitol, galactitol, glicerol e ciclitóis, tais como inositol; PEG; polímeros de aminoácidos; agentes redutores contendo enxofre, tais como ureia, glutationa, ácido tióctico, tioglicolato de sódio, tioglicerol, alfa-monotioglicerol e tiossulfato de sódio; polipeptídeos de baixo peso molecular (isto é, <10 resíduos); proteínas tais como HSA, albumina do soro bovino, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; monossacarídeos tais como xilose, manose, frutose e glicose; dissacarídeos tais como lactose, maltose e sacarose; trissacarídeos tais como rafinose, e polissacarídeos tais como dextrano.

[0161]Quando necessário ou benéfico, as fórmulas podem incluir um anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar a dor no local da injeção.

[0162]Exemplos de conservantes incluem fenol, álcool benzílico, meta-cresol, metil parabeno, propil parabeno, cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, haletos de benzalcônio, cloreto de hexametônio, alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol e 3-pentanol.

[0163]As fórmulas podem incluir, por exemplo, mais de 10^2 células B modificadas, mais de 10^3 células B modificadas, mais de 10^4 células B modificadas, mais de 10^5 células B modificadas, mais de 10^6 células B modificadas, mais de 10^7 células B modificadas, mais de 10^8 células B modificadas, mais de 10^9 células B modificadas, mais de 10^{10} células B modificadas ou mais de 10^{11} células B modificadas.

[0164]Métodos de uso. Os métodos revelados neste documento incluem

tratar pacientes (por exemplo, seres humanos, animais domésticos (cães, gatos, répteis, pássaros), animais de fazenda (por exemplo, equinos, bovinos, caprinos, suínos, galináceos) e animais de pesquisa (por exemplo, macacos, ratos, camundongos, peixes)) com fórmulas reveladas neste documento. O tratamento dos pacientes inclui distribuir quantidades terapeuticamente eficazes. Quantidades terapeuticamente eficazes incluem as que oferecem quantidades eficazes, tratamentos profilácticos e/ou tratamentos terapêuticos.

[0165]Uma "quantidade eficaz" é a quantidade de uma composição necessária para resultar em uma mudança fisiológica desejada no paciente. Quantidades eficazes são frequentemente administradas para fins de pesquisa. As quantidades eficazes relevadas neste documento podem provocar um efeito estatisticamente significativo em um modelo animal ou em um ensaio *in vitro* relevante à avaliação do desenvolvimento, progressão e/ou resolução de uma condição.

[0166]Um "tratamento profilático" inclui um tratamento administrado a um paciente que não exibe sinais ou sintomas de uma condição ou que exibe apenas os sinais ou sintomas iniciais de uma condição, de tal modo que o tratamento seja administrado com a finalidade de diminuir ou reduzir o risco de desenvolver a condição. Sendo assim, um tratamento profilático atua como um tratamento preventivo contra uma condição. Em modalidades específicas, os tratamentos profiláticos reduzem, retardam ou previnem a piora de uma condição. Modalidades específicas incluem a administração de uma fórmula descrita neste documento como proteção profilática na ausência de uma vacina atualmente eficaz. Modalidades específicas incluem a administração de uma fórmula descrita neste documento como proteção profilática em substituição a estratégias de vacinação convencionais. Modalidades específicas incluem a administração de uma fórmula descrita neste documento como proteção profilática em complementação a estratégias de

vacinação convencionais.

[0167]Um "tratamento terapêutico" inclui um tratamento administrado a um paciente que exibe sintomas ou sinais de uma condição e que é administrado ao paciente com a finalidade de diminuir ou eliminar esses sinais ou sintomas da condição. O tratamento terapêutico pode reduzir, controlar ou eliminar a presença ou atividade da condição e/ou reduzir o controle ou eliminar os efeitos colaterais da condição.

[0168]Em modalidades específicas, a condição é uma infecção.

[0169]As funções como uma quantidade eficaz, tratamento profiláctico ou tratamento terapêutico não são mutuamente excludentes, e, em modalidades específicas, as dosagens administradas podem satisfazer a mais de um tipo de tratamento.

[0170]Em modalidades específicas, as quantidades terapeuticamente eficazes produzem efeitos anti-patógeno. Efeitos anti-patógeno podem incluir efeitos anti-infecção. Efeitos anti-infecção podem incluir uma redução na ocorrência de infecções, uma redução na gravidade das infecções, uma redução na duração das infecções, uma redução no número de células infectadas, uma redução no volume de tecido infectado, um aumento na expectativa de vida, sensibilidade induzida das células infectadas para depuração imunológica, menos dor associada a infecção, e/ou redução ou eliminação de um sintoma associado à infecção tratada.

[0171]Em modalidades específicas, as quantidades terapeuticamente eficazes produzem efeitos anti-inflamatórios. Efeitos anti-inflamatórios podem incluir menos dor, calor, vermelhidão, inchaço e/ou perda de função associados a inflamação.

[0172]Em modalidades específicas, as quantidades terapeuticamente eficazes produzem efeitos anti-doença de Crohn ou efeitos anti-colite ulcerativa. Os efeitos anti-doença de Crohn ou anti-colite ulcerativa podem incluir menos diarreia,

menos hemorragia retal, menos perda de peso inexplicável, menos febre, menos dores e cãibras abdominais, menos fadiga e sensações de energia em baixa, e/ou recuperação do apetite.

[0173]Em modalidades específicas, as quantidades terapeuticamente eficazes produzem efeitos anti-artrite. Os efeitos anti-artrite podem incluir menos dor, rigidez, inchaço, vermelhidão nas articulações e/ou recuperação da amplitude de movimento. Os tipos de artrite incluem artrite reumatoide (RA), espondilite anquilosante e artrite psoriásica.

[0174]Em modalidades específicas, as quantidades terapeuticamente eficazes produzem efeitos anti-psoríase em placas. Os efeitos anti-psoríase em placas podem incluir menos eritemas, descamações, coceira, queimaduras, irritabilidade, anomalias nos leitos ungueais e/ou articulações inchadas ou rígidas.

[0175]Em modalidades específicas, células B podem ser obtidas de um paciente, um subconjunto de células B pode ser modificado *ex vivo* e, então, as células B modificadas podem ser formuladas e administradas ao paciente. Em modalidades específicas, um primeiro subconjunto de células B do paciente pode ser modificado com um primeiro constructo genético para produzir um anticorpo selecionado contra um primeiro patógeno, e um segundo subconjunto de células B do paciente pode ser modificado com um segundo constructo genético para produzir um anticorpo selecionado contra um segundo patógeno, produzindo assim anticorpos protetores contra dois patógenos. Conforme indicado, células B contra qualquer número de patógenos podem ser formadas e administradas ao paciente. Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados podem ser um anticorpo anti-RSV, um anticorpo anti-HIV, um anticorpo anti-vírus da Dengue, um anticorpo anti-*Bordetella pertussis*, um anticorpo anti-hepatite C, um anticorpo anti-vírus da influenza, um anticorpo anti-vírus da parainfluenza, um anticorpo anti-MPV, um anticorpo anti-citomegalovírus, um anticorpo anti-vírus Epstein Barr; um anticorpo

anti-herpes-vírus simples, um anticorpo anti-toxina bacteriana do *Clostridium difficile* e/ou um anticorpo anti-TNF. Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados podem ser um ou mais de um anticorpo anti-RSV, um anticorpo anti-vírus da influenza, um anticorpo anti-vírus da parainfluenza e/ou um anticorpo anti-MPV. Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados podem ser um anticorpo anti-RSV, um anticorpo anti-vírus da influenza, um anticorpo anti-vírus da parainfluenza e um anticorpo anti-MPV. Em modalidades específicas, o anticorpo selecionado é o palivizumabe.

[0176]Em modalidades específicas, células B podem ser obtidas de um doador de medula óssea ou de um doador de células-tronco hematopoiéticas imunologicamente compatível com o beneficiário. Em modalidades específicas, um primeiro subconjunto de células B do doador pode ser modificado com um primeiro constructo genético para produzir um anticorpo selecionado contra um primeiro patógeno, e um segundo subconjunto de células B do doador pode ser modificado com um segundo constructo genético para produzir um anticorpo selecionado contra um segundo patógeno, produzindo assim anticorpos protetores contra dois patógenos. Conforme indicado, células B contra qualquer número de patógenos podem ser formadas e administradas ao paciente. Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados podem ser um anticorpo anti-RSV, um anticorpo anti-HIV, um anticorpo anti-vírus da Dengue, um anticorpo anti-*Bordetella pertussis*, um anticorpo anti-hepatite C, um anticorpo anti-vírus da influenza, um anticorpo anti-vírus da parainfluenza, um anticorpo anti-MPV, um anticorpo anti-citomegalovírus, um anticorpo anti-vírus Epstein Barr; um anticorpo anti-herpes-vírus simples, um anticorpo anti-toxina bacteriana do *Clostridium difficile* e/ou um anticorpo anti-TNF. Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados podem ser um ou mais de um anticorpo anti-RSV, um anticorpo anti-vírus da influenza, um anticorpo anti-vírus da parainfluenza e/ou um anticorpo anti-MPV. Em modalidades específicas, os

anticorpos selecionados podem ser um anticorpo anti-RSV, um anticorpo anti-vírus da influenza, um anticorpo anti-vírus da parainfluenza e um anticorpo anti-MPV. Em modalidades específicas, o anticorpo selecionado é o palivizumabe. As células B geneticamente modificadas podem ser administradas ao beneficiário para prover proteção contra uma infecção (por exemplo, um efeito anti-infecção) até que as células transplantadas repovoem o próprio sistema imunológico do beneficiário.

[0177]Em modalidades específicas, o beneficiário recebe a medula óssea de um doador ou um transplante de células-tronco hematopoiéticas como tratamento contra uma malignidade hematológica. Exemplos de malignidades incluem leucemia linfocítica aguda, leucemia pró-linfocítica de células B, linfoma/leucemia de Burkitt, leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular (graus I, II, III ou IV), linfoma de Hodgkin, linfoma intravascular de grandes células B, linfoma, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de células do manto, linfoma da zona marginal (extranodal e nodal), linfoma mediastinal (tímico) de grandes células B, mieloma múltiplo, linfoma não Hodgkin, síndrome de POEMS / mieloma osteoesclerótico, linfoma primário de efusão, linfoma da zona marginal esplênica, pequeno linfoma linfocítico, mieloma múltiplo *smoldering* (SMM) e macroglobulinemia de Waldenstrom.

[0178]Em modalidades específicas, o beneficiário recebe células-tronco hematopoiéticas geneticamente modificadas que proporcionam um gene de que o beneficiário carece. Esses beneficiários podem ter uma imunodeficiência primária ou secundária que pode ser tratada com a provisão de um gene terapêutico através de células-tronco hematopoiéticas. Mais de 80 doenças de imunodeficiência primárias são reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde. Essas doenças são caracterizadas por um defeito intrínseco no sistema imunológico em que, em alguns casos, o corpo é incapaz de produzir qualquer anticorpo ou anticorpos suficientes contra uma infecção. Em outros casos, as defesas celulares para lutar contra a

infecção falham em funcionar corretamente. Tipicamente, as imunodeficiências primárias são transtornos hereditários. A imunodeficiência combinada grave ligada ao cromossomo X (SCID-X1) é outro exemplo de imunodeficiência primária. A SCID ligada ao cromossomo X resulta na depleção imunológica tanto celular quanto humoral causada por mutações no gene de cadeia gama comum (γ C), as quais resultam na ausência de linfócitos T e de células exterminadoras naturais (NK).

[0179]As imunodeficiências secundárias ou adquiridas não decorrem de anomalias genéticas hereditárias, mas, em vez disso, ocorrem em indivíduos nos quais o sistema imunológico está comprometido por fatores externos ao mesmo. Exemplos incluem trauma, vírus, quimioterapia, toxinas e poluição. A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é um exemplo de um transtorno de imunodeficiência secundário causado por um vírus, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), em que a depleção de linfócitos T incapacita o corpo a lutar contra uma infecção.

[0180]Em modalidades específicas, células B podem ser obtidas de um paciente, um subconjunto de células B pode ser modificado *ex vivo* e, então, as células B modificadas podem ser formuladas e administradas ao paciente. Em modalidades específicas, um primeiro subconjunto das células B do paciente pode ser modificado com um primeiro constructo genético para produzir um anticorpo selecionado contra uma molécula inflamatória, tal como uma citocina inflamatória, produzindo assim anticorpos que protegem contra a inflamação. Em modalidades específicas, os anticorpos selecionados podem ser anticorpos anti-TNF e/ou anticorpos anti-IL-1. Em modalidades específicas, o anticorpo selecionado é o infliximabe, adalimumabe e/ou golimumabe, e/ou um biossimilar aprovado dos mesmos.

[0181]Para a administração, quantidades terapeuticamente eficazes (também chamadas neste documento de doses) podem ser estimadas inicialmente

com base nos resultados de ensaios *in vitro* e/ou de estudos em modelos animais. Essas informações podem ser usadas para determinar com mais precisão doses úteis em pacientes de interesse. A quantidade de dose eficaz administrada a um paciente específico pode ser determinada por um médico, veterinário ou pesquisador levando em consideração parâmetros tais como fatores físicos e fisiológicos incluindo idade, vacinações prévias (se alguma), alvo, peso corporal, gravidade da condição, tipo da condição, estágio da condição, intervenções terapêuticas prévias ou concomitantes, idiopatia do paciente e via de administração.

[0182]Conforme indicado, em modalidades específicas, as células B modificadas expressam uma etiqueta que permite, por exemplo, o rastreamento e/ou eliminação após a administração ao paciente.

[0183]Exemplos de doses podem incluir, por exemplo, mais de 10^2 células B modificadas, mais de 10^3 células B modificadas, mais de 10^4 células B modificadas, mais de 10^5 células B modificadas, mais de 10^6 células B modificadas, mais de 10^7 células B modificadas, mais de 10^8 células B modificadas, mais de 10^9 células B modificadas, mais de 10^{10} células B modificadas ou mais de 10^{11} células B modificadas.

[0184]Em modalidades específicas, os efeitos dos anticorpos selecionados podem ser medidos usando titulações virais. "Titulação viral" refere-se à quantidade de vírus que pode ser detectada. Titulações virais elevadas significam níveis de infecção elevados. Uma resposta protetora ideal é observada com as titulações caindo a zero.

[0185]Como os versados na técnica perceberão, embora tenham-se descrito modalidades específicas, modalidades adicionais também podem ser utilizadas dentro do âmbito da presente invenção. A descrição a seguir oferece a descrição e habilitação de modalidades representativas adicionais.

MODALIDADES EXEMPLIFICATIVAS

1. Método para manipular geneticamente células B para que expressem um anticorpo selecionado, o método incluindo a introdução direcionada de um constructo genético que inclui (i) um promotor e (ii) um transgene que codifica uma porção do anticorpo selecionado em uma região intrônica que é constante em todas as células B e que é (i) posicionado em relação a um elemento intensificador que interage com o promotor para conduzir à expressão do transgene; e (ii) em uma configuração tal que uma porção do genoma codificante de anticorpos endógeno das células B não seja expressa.

2. Método para manipular geneticamente células B para que expressem um anticorpo selecionado, o método incluindo introduzir na SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3 ou SEQ ID N°: 4 um constructo genético que inclui ou que codifica (i) um promotor de cadeia pesada, (ii) um peptídeo de sinal, (iii) a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado; (iv) um ligante flexível ou um elemento saltador; (v) a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado; e (vi) uma junção de *splice*, manipulando geneticamente assim as células B para que expressem o anticorpo selecionado.

3. Método, de acordo com a modalidade 2, em que o genoma codificante de cadeia pesada variável endógeno nas células B não é extirpado durante a modificação genética.

4. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 3, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-Vírus Sincicial Respiratório, um anticorpo anti-vírus da imunodeficiência humana (HIV), um anticorpo anti-vírus da Dengue, um anticorpo anti-*Bordetella pertussis*, um anticorpo anti-hepatite C, um anticorpo anti-vírus da influenza, um anticorpo anti-vírus da parainfluenza, um anticorpo anti-metapneumovírus (MPV), um anticorpo anti-citomegalovírus, um anticorpo anti-vírus Epstein Barr; um anticorpo anti-herpes-vírus simples, um anticorpo anti-toxina bacteriana do *Clostridium difficile* ou um anticorpo anti-fator de

necrose tumoral (TNF).

5. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 4, em que o constructo genético inclui as SEQ ID Nº: 102-175, 278, 279 ou 280-289.

6. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 5, em que o ligante flexível fica entre a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado e a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado.

7. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 6, em que o ligante flexível é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 180-184.

8. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 7, em que o ligante flexível é um ligante Gly-Ser que inclui de 50 a 80 aminoácidos.

9. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 8, em que o ligante flexível é um ligante Gly-Ser que inclui 57 aminoácidos.

10. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 6, 8 ou 9, em que o ligante flexível é de SEQ ID Nº: 122-184.

11. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 10, em que o elemento saltador fica entre a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado e a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado.

12. Método, de acordo com uma das modalidades de 2 a 11, em que o elemento saltador é um peptídeo auto-clivante.

13. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades 12, em que o peptídeo auto-clivante é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 176-179.

14. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 13, em que o elemento saltador é um sítio interno de entrada no ribossomo (IRES).

15. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 14, em que o promotor de cadeia pesada é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 111 e 128.

16. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 15, em que o promotor de cadeia pesada é IgVH1-69 ou J558H10.

17. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 16, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de sinal é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 118, 134 e 185-194.

18. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 2 a 17, em que o peptídeo de sinal é derivado da cadeia pesada IgH humana ou da cadeia leve IgL humana.

19. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 18, em que o constructo genético inclui braços de homologia.

20. Método, de acordo com a modalidade 19, em que os braços de homologia incluem as SEQ ID Nº: 90-101, 110, 125, 127, 140, 142, 143, 153, 170, 171, 173, 174, 278 ou 279.

21. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 20, em que o constructo genético codifica uma etiqueta.

22. Método, de acordo com a modalidade 21, em que a etiqueta inclui uma STREPTAG®, etiqueta STREP® II, etiqueta de His, etiqueta Flag, etiqueta Xpress, etiqueta Avi, etiqueta de calmodulina, etiqueta de poliglutamato, etiqueta de HA, etiqueta de Myc, etiqueta Nus, etiqueta S, etiqueta de SBP, Softag 1, Softag 3 ou etiqueta V5.

23. Método, de acordo com a modalidade 21 ou 22, em que a etiqueta inclui a SEQ ID Nº: 122 ou 195-204.

24. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 23, incluindo ainda distribuir uma sequência de RNA guia (gRNA) selecionada dentre uma ou mais das SEQ ID Nº: 87-89 e 290-366 e uma nuclease às células B.

25. Método, de acordo com a modalidade 24, em que a distribuição se dá por eletroporação, por uma nanopartícula ou por distribuição mediada por vírus.

26. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 25, em que o constructo genético faz parte de um vetor viral adeno-associado.

27. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 24 a 26, em que o gRNA e a nuclease são distribuídos por eletroporação e o constructo genético é distribuído como parte de um vetor viral adeno-associado.

28. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 24 a 27, em que a nuclease é Cas9 ou Cpf1.

29. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 24 a 28, em que uma sequência alvo mirada por uma ou mais das sequências de gRNA é selecionada dentre uma ou mais das SEQ ID Nº: 5-84 e o gRNA é selecionado dentre uma ou mais das SEQ ID Nº: 87-89 e 290-366.

30. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-RSV que inclui palivizumabe, AB1128 ou ab20745.

31. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 30, em que o anticorpo selecionado é: palivizumabe incluindo uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 138 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 136; palivizumabe incluindo uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 138 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 205; um anticorpo anti-RSV que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 123 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 120; ou um anticorpo anti-RSV que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 123 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 206.

32. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 30, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-RSV que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 207, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 208, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 209; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 210, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 211 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 212.

33. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que inclui 10E8, VRC01, ab18633 ou 39/5.4A.

34. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29 ou 33, caracterizado pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 150 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 149.

35. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29 ou 33, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 213, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 214, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 215, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 216, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 217 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 218, ou uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 219, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 220, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 221, uma CDRL1 com QYGS, uma CDRL2 com SGS e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 222.

36. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da Dengue que inclui o anticorpo 55, DB2-3, ab155042 ou ab80914.

37. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29 ou 36, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da Dengue que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 223, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 224, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 225; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 226, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 227 e uma CDRKL3 com a SEQ ID Nº: 228, ou uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 229, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 230, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 231, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 232, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 233 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 234.

38. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-coqueluche que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 235 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 236.

39. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em

que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-hepatite C que inclui MAB8694 ou C7-50.

40. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29 ou 39, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-hepatite C que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 237, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 238, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 239, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 240, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 241 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 242.

41. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que inclui C102.

42. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29 ou 41, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 159 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 158.

43. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29 ou 41, em que o anticorpo anti-vírus da influenza que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 243, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 244, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 245, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 246, uma CDRL2 com KTS e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 247.

44. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-MPV que inclui MPE8.

45. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-CMV que inclui MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 ou LJP539.

46. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-EBV que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 168 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 166.

47. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-EBV que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 248, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 249, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 250, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 251, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 252 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 253.

48. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HSV que inclui HSV8-N e MB66.

49. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-*Clostridium difficile* que inclui actoxumabe ou bezlotoxumabe.

50. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-TNF que inclui infliximabe, adalimumabe, etanercepte, certolizumabe, ou biossimilares aceitos dos mesmos.

51. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 29 ou 50, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-TNF que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 254 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 255; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 256, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 257 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 258; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 259, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 260 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 261; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 262, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 263 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 264; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 265, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 266 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 267; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 268, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 269 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 270; ou uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 271, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 272 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 273.

52. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 51, em que a modificação genética utiliza uma sequência que inclui qualquer uma das SEQ

ID Nº: 87, 88, 89, 90-175, 278-366.

53. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 52, em que a célula B é uma célula B produtora de anticorpos, uma célula B de memória, uma célula B virgem, uma célula B B1 ou uma célula B da zona marginal.

54. Célula B modificada de acordo com um método de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 53.

55. Célula B, de acordo com a modalidade 54, em que a célula B é uma célula B secretora de anticorpos, uma célula B de memória, uma célula B virgem, uma célula B B1 ou uma célula B da zona marginal.

56. Método para produzir um efeito anti-infecção em um paciente que dele necessita, o método incluindo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma célula B de acordo com a modalidade 54 ou 55 ao paciente, produzindo assim um efeito anti-infecção.

57. Método, de acordo com a modalidade 56, em que elimina-se a necessidade de vacinação.

58. Método, de acordo com a modalidade 56 ou 57, em que a administração substitui um protocolo de vacinação.

59. Método, de acordo com a modalidade de 56 a 58, em que o paciente tem sua imunidade suprimida.

60. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 56 a 59, em que o paciente tem sua imunidade suprimida como parte de um regime de tratamento que inclui transplante de medula óssea, transplante de células-tronco hematopoiéticas ou administração de células-tronco hematopoiéticas geneticamente modificadas.

61. Método para produzir um efeito anti-inflamatório em um paciente que dele necessita, o método incluindo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma célula B de acordo com a modalidade 54 ou 55 ao paciente,

produzindo assim um efeito anti-inflamatório.

62. Constructo genético para modificar uma célula B para que expresse um anticorpo selecionado, o constructo genético incluindo ou codificando (i) um promotor de cadeia pesada, (ii) um peptídeo de sinal, (iii) a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado; (iv) um ligante flexível ou um elemento saltador; (v) a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado; e (vi) uma junção de *splice*.

63. Constructo genético, de acordo com a modalidade 62, incluindo as SEQ ID Nº: 102-175 ou 280-289.

64. Constructo genético, de acordo com a modalidade 62 ou 63, em que o ligante flexível fica entre a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado e a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado.

65. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 64, em que o ligante flexível é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 180-184.

66. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 65, em que o ligante flexível é um ligante Gly-Ser que inclui de 50 a 80 aminoácidos.

67. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 66, em que o ligante flexível é um ligante Gly-Ser que inclui 57 aminoácidos.

68. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 64, 66 ou 67, em que o ligante flexível é a SEQ ID Nº: 122.

69. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 68, em que o elemento saltador fica entre a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado e a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado.

70. Constructo genético, de acordo com uma das modalidades de 62 a 69, em que o elemento saltador é um peptídeo auto-clivante.

71. Constructo genético, de acordo com a modalidade 70, em que o peptídeo auto-clivante é selecionado dentre SEQ ID Nº: 176-179.

72. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 69, em que o elemento saltador é um sítio interno de entrada no ribossomo (IRES).

73. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 72, em que o promotor de cadeia pesada é selecionado dentre SEQ ID Nº: 111 e 128.

74. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 73, em que o promotor de cadeia pesada é IgVH1-69 ou J558H10.

75. Método, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 74, em que o peptídeo de sinal é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 118, 134 e 185-194.

76. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 75, em que o peptídeo de sinal é derivado da cadeia pesada IgH humana ou da cadeia leve IgL humana.

77. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 76, em que o constructo genético inclui braços de homologia.

78. Constructo genético, de acordo com a modalidade 77, em que os braços de homologia incluem as SEQ ID Nº: 90-101, 110, 125, 127, 140, 142, 143, 153, 170, 171, 173, 174, 278 ou 279.

79. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 78, em que o constructo genético codifica uma etiqueta.

80. Constructo genético, de acordo com a modalidade 79, em que a etiqueta inclui uma STREPTAG®, etiqueta STREP® II, etiqueta de His, etiqueta Flag, etiqueta Xpress, etiqueta Avi, etiqueta de calmodulina, etiqueta de poliglutamato, etiqueta de HA, etiqueta de Myc, etiqueta Nus, etiqueta S, etiqueta de SBP, Softag 1, Softag 3 ou etiqueta V5.

81. Constructo genético, de acordo com a modalidade 79 ou 80, em que a etiqueta inclui a SEQ ID Nº: 122 ou 195-204.

82. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-RSV que inclui palivizumabe, AB1128 ou ab20745.

83. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 82, em que o anticorpo selecionado é: palivizumabe incluindo uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 138 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 136; palivizumabe incluindo uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 138 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 205; um anticorpo anti-RSV que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 123 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 120; ou um anticorpo anti-RSV que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 123 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 206.

84. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 82, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-RSV que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 207, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 208, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 209; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 210, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 211 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 212.

85. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que inclui 10E8, VRC01, ab18633 ou 39/5.4A.

86. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81 ou 85, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 150 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 149.

87. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81 ou 85, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que inclui

uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 213, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 214, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 215, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 216, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 217 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 218, ou uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 219, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 220, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 221, uma CDRL1 com QYGS, uma CDRL2 com SGS e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 222.

88. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da Dengue que inclui o anticorpo 55, DB2-3, ab155042 ou ab80914.

89. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81 ou 88, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da Dengue que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 223, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 224, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 225; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 226, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 227 e uma CDRKL3 com a SEQ ID Nº: 228, ou uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 229, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 230, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 231, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 232, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 233 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 234.

90. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-coqueluche que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 235 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 236.

91. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-hepatite C que inclui MAB8694 ou C7-50.

92. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81 ou 91, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-hepatite C que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 237, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 238, uma

CDRH3 com a SEQ ID Nº: 239, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 240, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 241 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 242.

93. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que inclui C102.

94. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81 ou 93, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 159 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 158.

95. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81 ou 93, em que o anticorpo anti-vírus da influenza que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 243, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 244, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 245, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 246, uma CDRL2 com KTS e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 247.

96. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-MPV que inclui MPE8.

97. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-CMV que inclui MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 ou LJP539.

98. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-EBV que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 168 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 166.

99. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-EBV que inclui uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 248, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 249, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 250, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 251, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 252 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 253.

100. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HSV que inclui HSV8-N e MB66.

101. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-*Clostridium difficile* que inclui actoxumabe ou bezlotoxumabe.

102. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-TNF que inclui infliximabe, adalimumabe, etanercepte, certolizumabe, ou biossimilares aceitos dos mesmos.

103. Constructo genético, de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 81 ou 102, em que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-TNF que inclui uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 254 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 255; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 256, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 257 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 258; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 259, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 260 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 261; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 262, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 263 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 264; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 265, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 266 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 267; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 268, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 269 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 270; ou uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 271, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 272 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 273.

104. Kit para modificar geneticamente uma célula B, o kit incluindo um constructo genético de acordo com qualquer uma das modalidades de 62 a 103 e um gRNA que mira a SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 ou SEQ ID Nº: 4.

105. Kit, de acordo com a modalidade 104, em que o gRNA é selecionado dentre uma ou mais das SEQ ID Nº: 87, 88, 89 e 290-366.

106. Kit, de acordo com a modalidade 104 ou 105, incluindo ainda uma nuclease.

107. Kit, de acordo com a modalidade 106, em que a nuclease é Cas9 ou Cpf1.

108. Kit, de acordo com qualquer uma das modalidades de 104 a 107, incluindo ainda uma nanopartícula ou vetor viral adeno-associado.

109. Kit, de acordo com qualquer uma das modalidades de 104 a 108, em que o gRNA e a nuclease são associados a uma nanopartícula.

110. Kit, de acordo com qualquer uma das modalidades de 104 a 109, em que o constructo genético faz parte de um vetor viral adeno-associado.

[0186]Exemplo 1: Provendo proteção vitalícia contra infecções pelo vírus sincicial respiratório sem uma vacina. O vírus sincicial respiratório (RSV) é uma das principais causas de doença respiratória grave em crianças pequenas, em especial recém-nascidos com doença pulmonar crônica, cardiopatia congênita ou nascimento prematuro. A imunidade humoral pode mediar uma proteção eficaz contra o RSV, demonstrada pelos efeitos terapêuticos do anticorpo recombinante Synagis® (MedImmune, Inc.)/palivizumabe. No entanto, tanto a infecção natural quanto os ensaios de vacina anteriores fracassaram em induzir a uma resposta imunológica protetora contra o RSV.

[0187]No caso do RSV e de outras doenças difíceis de vacinar, contornar a vacinação através da engenharia de células B primárias para provocar a expressão de um anticorpo terapêutico desejado é extremamente atrativo. Os lócus de imunoglobulina (Ig) são extremamente grandes, diversos e estão sujeitos a larga recombinação e edição genômicas. Além disso, a transcrição de genes da imunoglobulina para produzir tanto formas de membrana quanto formas secretadas conta com a regulação do *splicing* de mRNA e da poliadenilação por elementos reguladores do DNA. Essa complexidade tornou a transdução viral, a abordagem

tradicional para a engenharia celular de linfócitos, tecnicamente impraticável para a produção de células B terapêuticas.

[0188] Modalidades específicas incluem uma plataforma para a reprogramação rápida e seletiva da especificidade de anticorpos de células B primárias por engenharia imunogenética em um só golpe. Essa plataforma tira proveito da alta atividade da via de reparo de DNA via junção de extremidades mediada por micro-homologia em células B primárias para introduzir um modelo de DNA de fita dupla/fita única híbrido totalmente sintético após a criação de quebras de DNA por riboproteínas Cas9/sgRNA. A chave para essa abordagem é a preservação de elementos reguladores endógenos, o que permite o controle nativo da expressão de anticorpos ligados à superfície e de anticorpos secretados. Ademais, a estratégia não se restringe ao RSV. É possível expressar anticorpos protetores contra praticamente qualquer patógeno com uma única coleta de sangue e a subsequente infusão de células alguns dias mais tarde.

[0189] Materiais e Métodos. Desenvolvimento de sgRNA. sgRNAs mirando sequências intrônicas nos lócus da IgH murídeos e humanos foram desenvolvidos usando o CrispRGold (crisprgold.mdc-berlin.de) e produzidos em forma sintética incorporando análogos da 2'-O-metila e ligações de 3' fosforotioato entre nucleotídeos nos primeiros três resíduos de RNA terminais 5' e 3' (Synthego). As sequência mirando o genoma são as seguintes:

Murídea: UUAUACAGUAUCCGAUGCAU (SEQ ID Nº: 87)

Humana: GUCUCAGGAGCGGUGUCUGU (SEQ ID Nº: 89)

[0190] Desenvolvimento e montagem de sequências-modelo.

[0191] Humana: O constructo de anticorpos incluiu a região promotora de cadeia pesada IgVH1-69 (SEQ ID Nº: 111), a cadeia leve de comprimento total do palivizumabe otimizada por códon (SEQ ID Nº: 113 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 120 (aminoácido)), um ligante glicina-serina de 57 aminoácidos contendo 3 cópias

tandem do motivo da Streptag II (SEQ ID Nº: 116 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 122 (aminoácido)), a região variável da cadeia pesada do palivizumabe otimizada por códon (SEQ ID Nº: 117 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 123 (aminoácido)) e uma junção de *splice* com 60 bp de uma sequência flanqueadora derivada do segmento do gene IGHJ1 humano (SEQ ID Nº: 124).

[0192]Murídea: modelo mCherry incluído no promotor de cadeia pesada J5558H10, a fase de leitura aberta de mCherry completa otimizada por códon e o sítio de poliadenilação sv40. Os constructos de anticorpo incluíram o promotor de cadeia pesada J5558H10 (SEQ ID Nº: 128, V.A Love *et al.*, *Molecular Immunology*, 2000), a cadeia leve de comprimento total do anticorpo otimizada por códon (SEQ ID Nº: 130 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 135 (aminoácido)), um ligante glicina-serina de 57 aminoácidos contendo duas cópias *tandem* da sequência de Streptag II (SEQ ID Nº: 116 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 122 (aminoácido)), a região variável da cadeia pesada do anticorpo otimizada por códon (SEQ ID Nº: 133 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 138 (aminoácido)) e uma junção de *splice* com 60 bp de uma sequência flanqueadora do segmento do gene IGHJ3 murídeo (SEQ ID Nº: 139).

[0193]Anelamento de oligonucleotídeos de sutura (isto é, oligonucleotídeos de *splicing*). Oligonucleotídeos de sutura com 36 bp de complementaridade com a fita de DNA não alvo distal ao pam e proximal ao pam e 50 a 100 bp de complementaridade com o modelo introduzido foram produzidos sinteticamente e pré-anelados ao modelo de DNA antes do uso (por exemplo, SEQ ID Nº: 96-101). Os oligonucleotídeos de *splicing* podem prover “suturas de homologia”, conforme ilustra a FIG. 15.

[0194]Distribuição do modelo de vetor viral do vírus adeno-associado (AAV). Os vetores virais do AAV contiveram o promotor MND, uma fase de leitura aberta de mCherry completa otimizada por códon e o sítio de poliadenilação sv40 flanqueado ou por 2 sítios de reconhecimento de sgRNA murídeo ou por 400 bp de homologia.

Vírions do AAV foram produzidos em células 293T pseudotipadas com o capsídeo viral AAV6, purificados por centrifugação com gradiente sacarose e armazenados a -80°C. Para a distribuição viral do modelo de DNA, adicionou-se o vírus AAV concentrado a um volume final de 10% do volume de cultura total 12 h antes da eletroporação.

[0195]Cultura e eletroporação de células B murídeas. O meio de células B básico incluiu meio de RPMI com 10% de soro fetal bovino (Hyclone), 10 mM de HEPES (Gibco), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), 55 µM de β-mercaptoetanol (Sigma) e 100 U/ml de penicilina mais 100 µg/mL estreptomicina (Gibco), salvo nas etapas sem antibiótico, conforme indicado.

[0196]Células B foram isoladas do baço e dos linfonodos por seleção negativa com contas magnéticas (Miltenyi) e cultivadas por 24 horas a 2×10^6 /ml em meio de células B suplementado com 100 ng/ml de CD40L murídeo marcado com HA sem veículo recombinante (R&D systems), 100 ng/ml de anticorpo anti-HA (clone 543851, R&D systems) e 4 ng/ml de IL-4 murídea (R&D systems). Em seguida, as células B foram eletroporadas usando o sistema de transfecção Neon e 10 µl de ponta de acordo com o seguinte. A proteína Cas9 (Invitrogen) e o sgRNA sintético (Synthego) foram misturados a uma razão de 3 µg de Cas9/900 ng de sgRNA e incubados em temperatura ambiente por ao menos 10 minutos. As células B foram lavadas com PBS e suspensas em Tampão T Neon a uma densidade final de $2,5 \times 10^7$ células/ml com Cas9/sgRNA e o modelo de DNA pré-montado. As células foram eletroporadas (1.675 V, 10 milissegundos, 3 pulsos) e dispensadas imediatamente em meio pré-aquecido sem antibiótico.

[0197]Para a expansão celular, células B foram co-cultivadas com célula alimentadora 3T3-CD40L irradiada (80 gy) na presença de 20 ng/ml de IL-21 murídea.

[0198]Avaliação da atividade do sgRNA por Rastreamento de Indels por

Decomposição (TIDE). O DNA genômico total foi isolado de células tratadas com mock e Cas9 de 3 a 5 dias após a eletroporação. A região de 500 a 600 bp flanqueando o sítio cortado foi amplificada por PCR usando os oligos a seguir:

Murídeos: Direto: GGCTCCACCAGACCTCTCTA (SEQ ID Nº: 274)

Reverso: AACCTCAGTCACCGTCTCCT (SEQ ID Nº: 275)

Humanos: Direto: ACAGTAAGCATGCCTCCTAAG (SEQ ID Nº: 276)

Reverso: GCCACTCTAGGGCCTTGTT (SEQ ID Nº: 277)

[0199]Resultados. Os resultados são ilustrados nas FIGs. 18A a 18C, FIGs. 22A e 22B, FIGs. 23B a 23E e FIGs. 24A a 24C. As FIGs. 18A, 18B e 18C ilustram o corte bem-sucedido na linha de células B murídeas A20, na linha de células B murídeas primárias e na linha de células B humanas RAMOS, respectivamente, nos lóculos da IgH alvo após a eletroporação de células com proteínas ribonucleares Cas9/sgRNA. As FIGs. 22A e 22B ilustram a introdução de uma proteína repórter fluorescente mCherry no lóculo da IgH de células B murídeas primárias. As FIGs. 23B e 23C ilustram a expressão na superfície de um anticorpo anti-RSV após a introdução de um cassete de anticorpo parcial em linhas de células B murídeas A20 (FIG. 23B) e linhas de células B humanas RAMOS (FIG. 23C). As FIGs. 23D e 23E ilustram a secreção de um anticorpo anti-RSV após a introdução de um cassete de anticorpo parcial em linhas de células B murídeas A20 (FIG. 23D) e linhas de células B humanas RAMOS (FIG. 23E). A FIG. 24A ilustra a expressão na superfície de um anticorpo anti-RSV após a introdução de um cassete de anticorpo parcial em células B murídeas primárias, inicialmente (painéis à esquerda) e depois do enriquecimento e expansão *in vitro* (painéis à direita). A FIG. 24B ilustra a secreção de um anticorpo anti-RSV após a introdução de um cassete de anticorpo parcial em linhas de células B murídeas primárias. A FIG. 24C ilustra o potencial proliferativo *in vitro* de células B manipuladas.

[0200]Exemplo 2: O objetivo deste exemplo foi o de produzir células B

geneticamente modificadas com uma especificidade definida que mantivessem o controle nativo da expressão de Ig secretada e Ig na superfície através da engenharia de genoma do lócus da IgH. O lócus da IgH nas células B é uma região difícil de mirar na engenharia de genoma por causa das sequências altamente variadas presentes nas células B. O desenvolvimento das células B resulta na recombinação dos elementos V, D e J ao longo de mais de 1 megabase de DNA para gerar as regiões variáveis VDJ fundamentais à diversidade dos anticorpos. Posteriormente na ontogenia de células B, a alternância de classe entre diferentes regiões constantes resulta na perda de DNA ao longo de uma extensão de sequência semelhante (Analizado em Watson, et al., (2017), *Trends Immunol.*, 38(7): 459-470).

[0201]Essa variabilidade das sequências torna mirar diretamente regiões codificantes de anticorpo impraticável. No entanto, uma região de DNA pequena entre o último segmento gênico J e a região de alternância envolvida na alternância de classe se faz presente em todas as células B. Esse alvo universal contém o importante intensificador intrônico E μ , um dos vários fortes elementos intensificadores que cooperam para conduzir ao alto nível de expressão de genes da IgH, apesar de seus fracos promotores. A atividade desses intensificadores é regulada em parte pela proximidade dos promotores em relação ao intensificador E μ , e a introdução de um transgene entre os segmentos VDJ recombinados e o intensificador E μ é capaz de bloquear por inteiro a transcrição de VDJ (Delpy, et al., (2002), *J. Immunol.*, 169(12): 6875-6882). Por esse motivo, os métodos adotados neste exemplo miraram a área a montante do intensificador E μ para a introdução de um novo cassete de anticorpo (FIG. 26A). Ao mirar essa região, os genes de emAb introduzidos podem ser conduzidos por um promotor da IgH nativo (porém introduzido), maximizando assim o controle nativo da expressão da imunoglobulina.

[0202]Para permitir a introdução em um golpe e minimizar interações fora do

alvo, os constructos de emAb foram expressos por uma fusão de cadeia única. Essa fusão consiste em uma sequência de cadeia leve completa ligada à região variável da cadeia pesada por um ligante glicina-serina de 57 aminoácidos conforme descrito a respeito dos fragmentos F(ab) de cadeia única (Koerber, *et al.*, (2015), *J. Mol. Biol.*, 427(2): 576-586) (FIG. 26A). Esse ligante contém 3 repetições *tandem* do motivo de StreptagII para facilitar a detecção e enriquecimento de células geneticamente modificadas (Schmidt & Skerra (2007), *Nat. Protoc.* 2(6): 1528-1535). A ligação física das cadeias leve e pesada minimiza o risco de pareamento equívoco entre um emAb introduzido e a cadeia leve endógena. Uma junção de *splice* otimizada permite que os emAbs juntem-se a jusante das regiões constantes endógenas da IgH. Isso permite que os emAbs sejam expressos por qualquer uma das classes de isótopos de cadeia pesada.

[0203]A estratégia foi testada na linha de células B humanas RAMOS. Essa linha de células B derivada do linfoma de Burkitt expressa nativamente formas da IgM na superfície e secretadas pareadas com uma cadeia leve lambda. Nesses experimentos, a expressão de um emAb α RSV manipulado derivado do palivizumabe foi detectada usando a proteína RSV-F monomérica e estreptactina, uma estreptavidina modificada com alta afinidade pelos motivos de Streptag II no ligante. As células RAMOS geneticamente modificadas com emAb α RSV expressaram o anticorpo específico do RSV manipulado, que pôde ser detectado na superfície das células (FIG. 26B) e em forma secretada no sobrenadante (FIG. 26C). Para confirmar que um BCR de emAb une-se com complexos proteicos secundários cruciais para a sinalização do BCR, as células RAMOS foram expostas a estímulo com antígeno da RSV-F multimerizado. As células desenvolvidas com emAb α RSV exibiram, mas as células controle não, a sinalização rápida e sustentada de cálcio em resposta ao antígeno proteico (FIG. 26D). Esses dados serviram para confirmar a viabilidade da abordagem de engenharia do emAb.

[0204] Em seguida, células B primárias humanas foram geneticamente modificadas usando um processo de expansão e diferenciação em várias etapas (FIG. 27A). A eletroporação do RNA guia pré-complexado e Cas9 levou ao corte altamente eficaz do DNA genômico, resultando assim em reparos defeituosos dessa região em 70% dos alelos alvo analisados entre vários doadores independentes (FIG. 27B). O sítio alvo do sgRNA é fortemente conservado nos seres humanos, sem nenhum polimorfismo de nucleotídeo simples divulgado com uma frequência acima de 1% (FIG. 27C). A adição de um cassete de emAb αRSV distribuído por AAV reprogramou com eficácia as células B humanas para ligar-se à proteína RSV-F (FIG. 27D). Notadamente, células B com emAb foram produzidas com êxito por cada doador humano testado, com uma taxa de engenharia média de 24% (FIG. 27E). A cultura e diferenciação *in vitro* durante a produção do emAb aumentaram o potencial de secreção do anticorpo. As células iniciadas no dia 2 expressaram altos níveis de CD19 e pequenas quantidades dos marcadores de célula no plasma CD138, CD27 e CD138, à diferença das células no dia 18, que exibiram níveis inferiores de CD19 e superiores de CD38, CD27 e CD138 (FIG. 27F). Em consonância com essas alterações nos marcadores de superfície celular, as células B manipuladas com emAB diferenciadas secretaram quantidades significativas do anticorpo almejado (FIG. 27G). Juntos, esses dados demonstram a possibilidade de desenvolver com rapidez e eficácia células B primárias para produzir anticorpos protetores específicos.

[0205] Para demonstrar o aspecto flexível da plataforma, testaram-se cassetes de emAb derivados de 3 anticorpos anti-virais amplamente neutralizantes adicionais, incluindo o VRC01 direcionado anti-HIV, o AMM01 direcionado ao EBV e o MEDI8852 direcionado ao tronco da HA da influenza. Células B primárias foram reprogramadas com eficácia com todos os 4 constructos, que incluíram anticorpos tanto com cadeia leve kappa (palivizumabe, VRC01, Medi8852) quanto com cadeia

leve lambda (AMM01) (FIG. 28). Esses dados demonstram o caráter flexível e amplamente aplicável da plataforma de emAb.

[0206]O bloqueio à produção da cadeia pesada da Ig endógena é importante para maximizar a produção do emAb e minimizar o potencial para a produção de anticorpos endógenos desconhecidos por células geneticamente modificadas. A linha de células B RAMOS expressa endogenamente uma IgH pareada com uma cadeia leve lambda. A manipulação dessas células com um emAb α RSV ligado a uma cadeia leve kappa permite o uso da expressão da cadeia leve lambda na superfície como uma medida de expressão de IgH eficaz. Além disso, células RAMOS foram submetidas a uma translocação de c-myc, rompendo um alelo da IgH, para que qualquer introdução de emAb se desse necessariamente no alelo produtor (FIG. 29A). As células RAMOS de entrada expressam altos níveis de cadeia leve lambda na superfície, ao passo que as células que expressam o emAb α RSV exibem a perda praticamente total da expressão de lambda (FIG. 29B). Esses dados indicam que a introdução do emAb no alelo produtor pode bloquear com eficácia a expressão de uma IgH endógena. Em quase todas as células B primárias, um alelo da IgH possui uma reorganização de VDJ produtiva, ao passo que o outro alelo não foi submetido a recombinação de VDJ, ou foi recombinado de uma maneira improdutiva. No entanto, ambos esses alelos possuem sítios em potencial para a introdução do emAb (FIG. 29C). Para testar os efeitos da introdução do emAb, uma cadeia leve lambda purificada expressando células B primárias foi geneticamente modificada com emAb α RSV. As células de entrada continuaram expressando o anticorpo endógeno pareado com a cadeia leve lambda na superfície. Em contrapartida, metade das células B manipuladas com emAb α RSV perderam a expressão da cadeia leve lambda (FIG. 29D). Os padrões de expressão diferenciais observados nas células B RAMOS e células B primárias sugerem que a introdução do emAb é capaz de bloquear a expressão endógena da IgH se introduzido no alelo

produtor. A expressão diferencial da cadeia leve na superfície representa uma avenida para a purificação de células que expressam exclusivamente um constructo do emAb. Como alternativa, o potencial para introdução em qualquer um dos alelos oferece a possibilidade de produzir células com emAb expressando dois anticorpos ou pela seleção do acervo inicial de células B de memória anti-virais para engenharia ou pela introdução de um cassete diferente em cada alelo.

[0207]Tendo demonstrado a possibilidade de manipular células B, a capacidade protetora das células em modelos murídeos de infecção viral foi confirmada a seguir. Células B com emAb murídeas foram produzidas usando um processo de iniciação, eletroporação + distribuição de um cassete de emAb e expansão semelhante ao adotado em células B primárias humanas (FIG. 30A). A eletroporação em combinação com RNA guia pré-complexado e Cas9 levou a um corte altamente eficaz, resultando em reparos defeituosos dessa região em 80% do DNA analisado (FIG. 30B). A distribuição de um cassete de emAb α RSV murídeo foi feita por meio de células B murídeas reproduzivelmente modificadas, com 8% a 24% das células B murídeas ligando-se a RSV-F (FIG. 30C, 30D). A introdução em 1% a 7% das células também foi obtida usando DNA de fita dupla (dsDNA) contendo regiões de homologia curtas em vez de AAV (FIG. 30C, 30D (vide também o Exemplo 1), oferecendo assim potencial para a engenharia de células B com emAb usando componentes sintéticos. Titulações altas dos anticorpos desenvolvidos secretados também puderam ser detectadas nos sobrenadantes de cultura produzidos por ambas as metodologias (FIG. 30E).

[0208]Para testar o potencial de proteção antiviral, $1,5 \times 10^7$ células B murídeas geneticamente modificadas foram infundidas em camundongos Balbc/byJ selvagens, ao que seguiu-se a coleta de sangue e desafio com RSV (FIG. 31A). Anticorpos específicos do RSV e células B geneticamente modificadas fizeram-se presentes no sangue 6 dias após a transferência de células B geneticamente

modificadas (FIG. 31B, 31C). Vale ressaltar que os camundongos que receberam células B geneticamente modificadas foram quase que completamente protegidos contra infecção pelo RSV (FIG. 31D). Essa abordagem de proteção foi obtida pela injeção de palivizumabe 2 dias antes da injeção (FIG. 31D). A transferência de células com emAb mistas humanas mirando o RSV e a influenza a camundongos NOD-scid IL2Rgamma^{null} (NSG) levou a titulações no soro de anticorpos mirando ambos os vírus (FIGs. 32A, 32B). Esses resultados demonstram que as células B geneticamente modificadas reveladas neste documento protegem contra uma infecção viral.

[0209]Métodos. Desenvolvimento de sequências de modelos de anticorpo de cadeia única. Humanas: Os constructos de anticorpo incluíram a região promotora de cadeia pesada IgVH1-69 (SEQ ID Nº: 111), a cadeia leve de comprimento total do anticorpo (por exemplo, SEQ ID Nº: 113, 145, 154 e 161 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 119, 148, 157 e 165 (aminoácido)), um ligante glicina-serina de 57 aminoácidos contendo 3 cópias *tandem* do motivo de StreptagII (SEQ ID Nº: 116 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 122 (aminoácido)), a região variável da cadeia pesada (por exemplo, SEQ ID Nº: 117, 147, 156 e 164 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 123, 150, 159 e 168 (aminoácido)) e uma junção de *splice* com 60 pares de bases da sequência flankeadora derivada de regiões variáveis IgHJ compatíveis (por exemplo, SEQ ID Nº: 124 e 151).

[0210]*Murídeas*: Os constructos de anticorpo incluíram o promotor de cadeia pesada J5558H10 (SEQ ID Nº: 128, V.A Love *et al.*, *Molecular Immunology*, 2000), a cadeia leve de comprimento total do anticorpo otimizada por códon (por exemplo, SEQ ID Nº: 130 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 135 (aminoácido)), um ligante glicina-serina de 57 aminoácidos contendo três cópias *tandem* da sequência de streptag II (SEQ ID Nº: 116 (nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 122 (aminoácido)), a região variável da cadeia pesada do anticorpo otimizada por códon (por exemplo, SEQ ID Nº: 133

(nucleotídeo) e SEQ ID Nº: 138 (aminoácido) e uma junção de *splice* com 60 pares de bases da sequência flanqueadora derivada do segmento do gene IGHJ3 murídeo (por exemplo, SEQ ID Nº: 139).

[0211]As sequências completas de constructos de anticorpo exemplificativos são ilustradas nas FIGs. de 25B a 25I.

[0212]Produção de vetores recombinante do AAV. Vetores do AAV foram gerados pela transfecção tripla de vetor do AAV, capsídeo de sorotipo 6 e plasmídeos auxiliares adenovirais (pHelper) em células HEK293T por PEI. Com 24 horas após a transfecção, o meio foi trocado para DMEM sem soro, e, após 72 horas, as células foram coletadas, lisadas por congelamento-descongelamento, tratadas com benzonase e purificadas sobre gradiente iodixanol, ao que seguiu-se com concentração em PBS usando uma coluna Amicon Ultra-15 (EMD Millipore) (Choi, *et al.*, (2007), Curr. Protoc. Mol. Biol., Capítulo 16: Unidade 16 25). As titulações do estoque viral foram determinadas por qPCR dos genomas de AAV e variaram de 5×10^{10} a 1×10^{12} por microlitro (Aurnhammer, *et al.*, (2012), *Hum. Gene Ther. Methods* 23(1): 18-28).

[0213]Produção de modelos de emAb de dsDNA murídeo.

[0214]Modelos de emAb αRSV foram amplificados e regiões de homologia curtas foram adicionadas por oligos de DNA modificados de acordo com o seguinte:

Iniciador direto: (contém um fosfato 5', região de homologia genômica murídea em negrito)

/5Phos/**ACCACCTCTGTGACAGCATTATACAGTATCCGATGGACAAGT**
GAGTGTCAGGTTAGGATTCT (SEQ ID Nº: 278)

Iniciador reverso (contém ligações de DNA estabilizadas com fosforotioato (*) região de homologia genômica murídea em negrito)

T*A*A*AGAAAGTGCCCCACTCCACTCTTGTCCCTATGCTTGACCACAA
TGAATACTCCCCACC (SEQ ID Nº: 279)

O modelo de dsDNA foi amplificado por PCR, purificado e concentrado usando colunas de limpeza PCR minElute (Qiagen).

[0215]Linhas celulares. Obtiveram-se células 3T3-msCD40L da Dr. Mark Connors no Programa de Reagentes da AIDS do NIH, Divisão da AIDS, NIAID, NIH: Cat#12535. Células 3T3 foram cultivadas em meio de DMEM com 10% soro fetal bovino (Gibco), 100 U/ml penicilina mais 100 µg/mL estreptomicina (Gibco) e G418 (350 µg/mL).

[0216]Obtiveram-se células RAMOS da ATCC (CRL-1596™). Células RAMOS foram cultivadas em meio de RPMI com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 100 U/ml de penicilina mais 100 µg/mL estreptomicina (Gibco).

[0217]Cultura e eletroporação de células B murídeas. O meio de células B básico incluiu meio de RPMI com 10% de soro fetal bovino (Gemini Biosciences), 10 mM de HEPES (Gibco), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), 55 µM de β-mercaptoetanol (Sigma), e 100 U/ml de penicilina mais 100 µg/mL estreptomicina (Gibco), salvo nas etapas sem antibiótico, conforme indicadas.

[0218]Células B foram isoladas do baço e dos linfonodos por seleção negativa com contas magnéticas (Miltenyi) e cultivadas por 24 horas a 2×10^6 /ml em meio de células B suplementado com 100 ng/ml de CD40L murídeo marcado com HA sem veículo recombinante (R&D systems), 100 ng/ml de anticorpo anti-HA (clone 543851, R&D systems) e 4 ng/ml de IL-4 murídea (R&D systems). Em seguida, as células B foram eletroporadas usando o sistema de transfecção Neon de acordo com o seguinte. A proteína Cas9 (Invitrogen) e o sgRNA sintético (Synthego) foram misturados a uma razão de 1 µg de Cas9 para 300 ng de sgRNA e incubados em temperatura ambiente por ao menos 10 minutos. As células B foram lavadas com PBS e suspensas em Tampão Neon T a uma densidade final de $2,5 \times 10^7$ células/ml com 12 µg de Cas9 RNP/ 10^6 células. Nas condições de dsDNA, 7,5 µg de modelo de dsDNA/ 10^6 células também foram incluídos na eletroporação. As células foram

eletroporadas (1.675 V, 10 milissegundos, 3 pulsos) e dispensadas imediatamente em meio pré-aquecido sem antibiótico. Nas condições de AAV, adicionou-se AAV concentrado em PBS até 15% do volume de cultura final. Após a eletroporação, células B foram expandidas por mais 48 horas com meio de células B suplementado com 100 ng/ml de CD40L murídeo marcado com HA sem veículo recombinante (R&D systems), 100 ng/ml de anticorpo anti-HA (clone 543851, R&D systems), 4 ng/ml de IL-4 murídea (R&D systems) e 20 ng/ml de IL-21 murídea (Biolegend). Para a expansão secundária, células B foram co-cultivadas com células alimentadoras 3T3-CD40L do NIH irradiadas (80 gy) na presença de 20 ng/ml de IL-21 murídea (Biolegend).

[0219]Cultura e eletroporação de células B humanas. Meio basal para o cultivo de células B humanas (hBCM) foi introduzido em meio de IMDM com 10% de FBS (Gemini Biosciences), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco), salvo nas etapas sem antibiótico, conforme indicadas.

[0220]Obtiveram-se PBMCs humanas junto ao Centro de Pesquisa do Câncer Fred Hutchinson. As células foram descongeladas e isoladas por seleção negativa usando o Kit de Isolamento de Células B Miltenyi II (Humano), de acordo com o protocolo da fabricante. As células isoladas foram ressuspensas a 0,5 a $1,0 \times 10^6$ células/mL em hBCM suplementado com 100 ng/mL de MEGACD40L (Enzo Life Sciences), 50 ng/mL de IL-2 recombinante (Biolegend), 50 ng/mL de IL-10 (Shenandoah Biotech), 10 ng/mL de IL-15 (Shenandoah Biotech) e 1 µg/mL de CpG ODN 2006 (IDT).

[0221]Após 48 horas de estímulo, as células foram eletroporadas usando o Sistema de Transfecção Neon. A proteína Cas9 (Invitrogen) e o sgRNA H7 (Synthego) foram pré-complexados a uma razão de 2:1 em Tampão T por 20 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS (Gibco) e ressuspensa em Tampão T a uma concentração final de $2,5 \times 10^7$ células/ml em

Tampão T contendo RNP Cas9 pré-complexada. A mistura Célula-RNP foi carregada em uma Ponta de Transfecção Neon de 10 µL e eletroporada de acordo com o protocolo da fabricante com as configurações de 1.750 V, 20 ms e 1 pulso. Imediatamente após a eletroporação, as células foram plaqueadas em meio de estímulo conforme descrito acima, sem antibiótico. Após 30 minutos, o AAV foi adicionado a uma concentração final de 10% a 15% de volume de cultura e totalmente misturado. Após 2 a 4 horas, as células foram transferidas a um prato de cultura maior para permitir nova expansão.

[0222]Dois dias após a eletroporação, as células foram tingidas com antígeno marcado com fluorocromo ou estreptactina, e células geneticamente modificadas foram selecionadas. Para a expansão secundária, células B foram co-cultivadas com células alimentadoras 3T3-CD40L do NIH irradiadas (80 gy) contendo 5 µg/mL de insulina humana recombinante (Sigma), 50 µg/mL de Transferrina (Sigma), 50 ng/mL de IL-2 recombinante (Biolegend), 20 ng/mL de IL-21 (Biolegend) e 10 ng/mL de IL-15 (Shenandoah Biotech).

[0223]A fim de promover a diferenciação em células plasmáticas, as células foram transfetadas de condições de expansão a condições de cultura fresca sem células alimentadoras contendo hBCM suplementado com 5 µg /mL de insulina humana recombinante (Sigma), 50 µg/mL de Transferrina (Sigma), 500 U/mL de Proteína IFN Tipo I Universal (Sistemas R&D), 50 ng/mL de IL-6 (Shenandoah Biotech) e 10 ng/mL de IL-15 (Shenandoah Biotech).

[0224]Avaliação da atividade do sGRNA por TIDE. O DNA genômico total foi isolado de células tratadas com mock e cas9/sgRNA em 3 a 5 dias após a eletroporação. A região de 500 a 600 pares de bases flanqueando o sítio alvo do sgRNA foi amplificada por PCR usando os oligos a seguir:

Muídeos:

Direto: GGCTCCACCAGACCTCTCTA (SEQ ID N°: 274)

Reverso: AACCTCAGTCACCGTCTCCT (SEQ ID Nº: 275)

Humanos:

Direto: ACAGTAAGCATGCCTCCTAAG (SEQ ID Nº: 276)

Reverso: GCCACTCTAGGGCCTTGTT (SEQ ID Nº: 277)

[0225]O produto da PCR purificado foi sequenciado por Sanger, e a frequência de indels em células eletroporadas com Cas9/sgRNA em relação a células eletroporadas com mock foi determinada usando o algoritmo ICE (Hsiao, *et al.*, (2018), "Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data", bioRxiv).

[0226]Antígenos de proteína. A proteína F pré-fusão do RSV, o complexo gh/gl do EBV e o antígeno env do HIV modificado (426c TM4 d1-3) foram produzidos conforme descrito (McLellan, *et al.*, (2013), *Science* 342(6158): 592-598; McGuire, *et al.*, (2016), *Nat. Commun.* 7: 10618; Snijder, *et al.*, (2018), *Immunity* 48(4): 799-811 e799). O tronco da HA da influenza estabilizado foi produzido a partir do clone VRC 3925, derivado da linhagem H1 1999 NC conforme descrito (Yassine, *et al.*, (2015), *Nat. Med.* 21(9): 1065-1070). A proteína F pré-fusão do RSV monomérica foi marcada com Alexa-488 (Thermo Fisher). Todas as demais proteínas foram conjugadas com a biotina usando uma razão molar de biotina:proteína entre 0,8 a 2, seguidas por tetramerização com estreptavidina-PE ou -APC (prozyme)

[0227]Citometria de fluxo. A análise por citometria de fluxo foi realizada em uma máquina FACSymphony (BD bioscience), as células foram classificadas em uma Aria II (BD bioscience), e os dados foram analisados usando o software FlowJo (Tree Star).

[0228]Estudos terapêuticos do EmAb em camundongos. Os estudos em animais foram aprovados e conduzidos de acordo com o Comitê Institucional de Uso e Cuidado com os Animais do Centro do Câncer Fred Hutchinson.

[0229]No desafio com o RSV, o EmAb ou células B controle foram administrados em uma dose intraperitoneal (IP) única de $1,5 \times 10^7$ células. Na

transferência passiva do palivizumabe, os camundongos receberam uma dose única de 15 mg/kg por via IP. O RSV expressando a GFP (chamado neste documento de RSV para fins de simplicidade) foi fornecido generosamente (Munir, *et al.*, (2008). *J Virol* 82(17): 8780-8796). Camundongos BALB/cByJ de idade compatível (Jackson Labs) foram inoculados por via intranasal com 10^6 *pfu* de RSV purificado por sacarose em 40 µL de PBS. Os pulmões foram recolhidos no dia 5 após a infecção, e a titulação foi determinada, conforme descrito previamente, por ensaio de placas (Murphy, *et al.*, (1990), *Vaccine* 8(5): 497-502). Em suma, os pulmões foram homogeneizados em 2 ml de meio em um dissociador GentleMACS, clarificados por centrifugação a 400×g por 10 minutos, em seguida congelados *flash* e armazenados a -80° C. O sobrenadante foi diluído a 1:10 e 1:20 em meio de DMEM em duplicata. Adicionaram-se 100 µL de cada diluição a células Vero confluentes em placas de 24 poços por 2 horas a 37° C. Um revestimento de 0,8% de metilcelulose foi então adicionado, e as placas foram incubadas por 5 dias antes de gerar imagens em um gerador de imagens Typhoon com as configurações de filtro para GFP. A titulação em *pfu*/pulmão foi calculada contabilizando o número de placas na diluição positiva mais alta e corrigindo o fator de diluição.

[0230]Para o enxerto de células humanas, células B humanas com emAb foram administradas em uma dose IP única de 5×10^6 células/especificidade do emAb (1×10^7 total) a camundongos NOD-*scid IL2Rgamma*^{null} (NSG) (produzidos pelo instrumento de reprodução FHCRC). Setes dias após a transferência, o sangue foi coletado, e as titulações de emAb humano para RSV-F e tronco da HA no soro foram determinadas por ELISA.

[0231]Análises Estatísticas. As análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism 7. Comparações em pares foram realizadas usando o teste t não pareado com correção de Welch.

[0232]As sequências de ácido nucleico descritas neste documento são

ilustradas usando as abreviações em letra padrão para as bases de nucleotídeo, conforme definido no Código de Regulações Federais dos Estados Unidos título 37 §1.822. Em alguns casos, só uma fita de cada sequência de ácido nucleico é ilustrada, mas entende-se a fita complementar como incluída em modalidades onde ela seria apropriada. À guisa de exemplo, sequências complementares para sítios alvo que incluem a SEQ ID Nº: 5-84 oferecem sequências que miram o gRNA para mirar esses sítios.

[0233]Qualquer ácido nucleico que codifique um constructo de anticorpo selecionado conforme descrito neste documento pode ser utilizado. Variantes de sequências de ácido nucleico reveladas neste documento incluem vários polimorfismos, mutações e alterações de sequência, em que as diferenças na sequência não afetam significativamente a função da proteína codificada. Os termos "ácido nucleico" ou "gene" podem incluir não só sequências codificantes mas também regiões reguladoras, tais como promotores, intensificadores e regiões de término. Os termos podem incluir ainda todos os íntrons e outras sequências de DNA modificadas por *splicing* a partir do transcrito de mRNA, junto com variantes decorrentes de sítios de *splice* alternativos. "Ácido nucleico codificante" pode ser um DNA ou RNA que dirige a expressão de um ou mais constructos do anticorpo selecionado. Essas sequências de ácido nucleico podem ser uma sequência de fita de DNA que é transcrita em um RNA ou uma sequência de RNA que é traduzida na proteína. As sequências de ácido nucleico incluem tanto as sequências de ácido nucleico de comprimento total quanto sequências de comprimento não total derivadas da proteína de comprimento total. As sequências também podem incluir degenerar códons da sequência nativa ou sequências que podem ser introduzidas para oferecer a preferência pelo códon em um tipo de célula específico. Sequências de ácido nucleico que codificam constructos do anticorpo selecionado podem ser preparadas prontamente a partir da sequência de aminoácidos relevante de um

constructo do anticorpo selecionado.

[0234]“Variantes” de sequências de proteína incluem aquelas com uma ou mais adições, deleções, posições de parada ou substituições de aminoácido, em comparação a uma sequência de proteína relevada em outras partes neste documento.

[0235]Uma substituição de aminoácido pode ser uma substituição conservadora ou não conservadora. As variantes de sequência de proteína reveladas neste documento podem incluir aquelas com uma ou mais substituições de aminoácido conservadoras. Uma “substituição conservadora” ou “substituição de aminoácido conservadora” envolve uma substituição encontrada em um dos grupos de substituições conservadoras a seguir: Grupo 1: A, G, S, T; Grupo 2: D, E; Grupo 3: N, Q; Grupo 4: R, K, H; Grupo 5: I, L, M, V; e Grupo 6: F, Y, W.

[0236]Além disso, os aminoácidos podem ser agrupados em grupos de substituições conservadoras por função, estrutura química ou composição semelhante (por exemplo, ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos ou contendo enxofre). Por exemplo, um grupamento alifático pode incluir, para fins de substituição, G, A, V, L, e I. Outros grupos incluindo aminoácidos que são considerados substituições conservadoras um pelo outro incluem: contendo enxofre: M e C; ácidos: D, E, N e Q; pequenos resíduos alifáticos, apolares ou levemente polares: A, S, T, P e G; resíduos polares de carga negativa e suas amidas: D, N, E e Q; resíduos polares de carga positiva: H, R e K; grandes resíduos alifáticos apolares: M, L, I, V e C; e grandes resíduos aromáticos: F, Y e W.

[0237]Substituições não conservadoras incluem aquelas que afetam significativamente: a estrutura do *backbone* peptídico na área da alteração (por exemplo, a estrutura em alfa-hélice ou beta-folha); a carga ou hidrofobia da molécula no sítio alvo; ou o grosso da cadeia lateral. Substituições não conservadoras que em geral espera-se que produzam as maiores mudanças nas propriedades da proteína

são aquelas em que (i) um resíduo hidrófilo (por exemplo, S ou T) pode ser substituído com (ou por) um resíduo hidrófobo (por exemplo, L, I, F, V ou A); (ii) um C ou P pode ser substituído com (ou por) qualquer outro resíduo; (iii) um resíduo com uma cadeia lateral eletropositiva (por exemplo, K, R ou H) pode ser substituído com (ou por) um resíduo eletronegativo (por exemplo, Q ou D); ou (iv) um resíduo com uma cadeia lateral volumosa (por exemplo, F) pode ser substituído com (ou por) outro sem uma cadeia lateral volumosa (por exemplo, G). Mais informações são encontradas em Creighton (1984), *Proteins, W.H. Freeman and Company*.

[0238] Variantes de sequências de ácido nucleico e proteína reveladas neste documento também incluem sequências com ao menos 70% de identidade de sequência, ao menos 80% de identidade de sequência, ao menos 85% de identidade de sequência, ao menos 90% de identidade de sequência, ao menos 95% de identidade de sequência, ao menos 96% de identidade de sequência, ao menos 97% de identidade de sequência, ao menos 98% de identidade de sequência, ou ao menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de referência revelada neste documento.

[0239] A "porcentagem (%) de identidade de sequência" em relação a sequências identificadas neste documento é definida pela porcentagem de resíduos de ácido nucleico ou aminoácido em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de ácido nucleico ou aminoácido em uma sequência de referência depois de alinhar as sequências e introduzir lacunas, se necessário, para garantir a porcentagem de identidade de sequência máxima. O alinhamento com a finalidade de determinar a porcentagem de identidade entre sequências de ácido nucleico ou aminoácidos pode ser obtido de várias maneiras conhecidas pelos versados na técnica, por exemplo, usando um software de computador disponibilizado para o público como o BLAST, o BLAST-2, o ALIGN ou o ALIGN-2 ou o Megalign (DNASTAR). Os versados na técnica podem determinar parâmetros adequados para

mensurar o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para obter o alinhamento maximal sobre o comprimento total das sequências sendo comparadas. Por exemplo, os valores de % de identidade de sequência gerados usando o programa de computador WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)) usam vários parâmetros de busca, a maioria dos quais são definidos nos valores padrão. Os valores que não são definidos nos valores padrão (isto é, os parâmetros ajustáveis) são definidos com os valores a seguir: extensão de sobreposição = 1, fração de sobreposição = 0,125, limite de palavras (T) = 11 e matriz de pontuação BLOSUM62.

[0240]As variantes exibirão tipicamente a mesma atividade biológica qualitativa e provocarão uma resposta biológica substancialmente semelhante a uma sequência de ácido nucleico ou peptídeo de referência; embora seja possível selecionar variantes para modificar as características de um ácido nucleico ou peptídeo de referência de acordo com o necessário. Triagens de variantes podem realizadas usando protocolos experimentais descritos neste documento.

[0241]Como os versados na técnica perceberão, cada modalidade revelada neste documento pode compreender, consistir essencialmente em ou consistir em seu elemento, etapa, ingrediente ou componente mencionado específico. Sendo assim, os termos "incluir" ou "incluindo" devem ser interpretados como: "compreender, consistir em ou consistir essencialmente em". O termo de transição "compreender" significa "incluir", mas não é exaustivo, e permite a inclusão de elementos, etapas, ingredientes ou componentes não especificados, mesmo em grandes quantidades. O sintagma de transição "consistir em" exclui qualquer elemento, etapa, ingrediente ou componente não especificado. O sintagma de transição "consistir essencialmente em" limita o âmbito da modalidade aos elementos, etapas, ingredientes ou componentes especificados e àqueles que não afetam materialmente a modalidade. Um efeito material causaria uma redução

estatisticamente significativa na expressão de células B de um anticorpo selecionado.

[0242]Salvo indicação em contrário, todos os números que expressam quantidades de ingredientes, propriedades, tais como o peso molecular, condições da reação, entre outros, usados no relatório descritivo e nas reivindicações devem ser interpretados como se fossem modificados, em todos os casos, pelo termo “cerca de”. Portanto, salvo indicação em contrário, os parâmetros numéricos estabelecidos no relatório descritivo e nas reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas cuja obtenção é almejada pela presente invenção. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar a aplicação da doutrina de equivalentes ao âmbito das reivindicações, cada parâmetro numérico deve ser interpretado considerando-se ao menos o número de dígitos significativos indicados e aplicando-se técnicas de arredondamento habituais. Quando mais clareza é necessária, o termo “cerca de” tem o significado razoavelmente atribuído a ele pelos versados na técnica quando usado junto com um valor ou faixa numérica mencionado, isto é, indicando um tanto mais ou um tanto menos que o valor ou faixa mencionado, dentro de uma faixa de $\pm 20\%$ do valor mencionado; $\pm 19\%$ do valor mencionado; $\pm 18\%$ do valor mencionado; $\pm 17\%$ do valor mencionado; $\pm 16\%$ do valor mencionado; $\pm 15\%$ do valor mencionado; $\pm 14\%$ do valor mencionado; $\pm 13\%$ do valor mencionado; $\pm 12\%$ do valor mencionado; $\pm 11\%$ do valor mencionado; $\pm 10\%$ do valor mencionado; $\pm 9\%$ do valor mencionado; $\pm 8\%$ do valor mencionado; $\pm 7\%$ do valor mencionado; $\pm 6\%$ do valor mencionado; $\pm 5\%$ do valor mencionado; $\pm 4\%$ do valor mencionado; $\pm 3\%$ do valor mencionado; $\pm 2\%$ do valor mencionado; ou $\pm 1\%$ do valor mencionado.

[0243]Não obstante as faixas numéricas e parâmetros que definem o vasto âmbito da invenção serem aproximações, os valores numéricos definidos nos exemplos específicos são tidos como os mais precisos possíveis. Qualquer valor

numérico, contudo, contém inherentemente certos erros necessariamente decorrentes do desvio padrão encontrado em suas respectivas medições de teste.

[0244]Os termos "um", "uns", "uma", "umas", "o", "os", "a" e "as" e seus semelhantes usados no contexto de descrever a invenção (em especial no contexto das reivindicações a seguir) devem ser interpretados de modo a abranger tanto o singular quanto o plural, salvo indicação em contrário neste documento ou quando o contexto ditar claramente o contrário. A citação de faixas de valores neste documento visa meramente a servir como um método abreviado de referir-se individualmente a cada valor distinto dentro da faixa. Salvo indicação em contrário neste documento, cada valor individual incorpora-se ao relatório descritivo como se fosse citado individualmente neste documento. Todos os métodos descritos neste documento podem ser praticados em qualquer ordem adequada, salvo indicação em contrário ou quando o contexto ditar claramente o contrário. O uso de todo e qualquer exemplo, ou jargão exemplificativo (por exemplo, "tal como"), dado neste documento visa meramente a elucidar melhor a invenção e não impõe nenhuma limitação ao âmbito da invenção de resto reivindicada. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada de modo a indicar qualquer elemento não reivindicado como essencial à prática da invenção.

[0245]Grupos de elementos ou modalidades alternativos da invenção relevados neste documento não devem ser interpretados como limitações. Cada membro de um grupo pode ser aludido e reivindicado individualmente ou em qualquer combinação a outros membros do grupo ou outros elementos encontrados nele. Espera-se que um ou mais membros de um grupo possam ser incluídos em um grupo, ou excluídos dele, para fins de conveniência e/ou patenteabilidade. Quando uma inclusão ou exclusão desse tipo acontecer, o relatório descritivo visa a conter o grupo conforme modificado, satisfazendo assim a descrição por escrito de todos os grupos de Markush nas reivindicações anexas.

[0246]Certas modalidades da presente invenção são descritas neste documento, incluindo o melhor modo conhecido pelos inventores para praticá-la. Certamente, variações dessas modalidades descritas ocorrerão aos versados na técnica mediante a leitura da descrição acima. O inventor espera que os versados na técnica empreguem essas variações conforme apropriado, e os inventores pretendem que a invenção seja praticada de outras formas além das descritas especificamente neste documento. Logo, a presente invenção inclui todas as modificações e equivalentes da matéria inventiva exposta nas reivindicações anexas a este documento de acordo com o permitido pela legislação cabível. Além disso, qualquer combinação dos elementos descritos acima em todas as suas variações possíveis é coberta pela invenção, salvo indicação em contrário neste documento ou quando o contexto ditar claramente o contrário.

[0247]Ademais, fizeram-se várias referências a patentes, publicações impressas, artigos de jornal e outros textos redigidos ao longo deste relatório descriptivo (materiais aludidos neste documento). Cada um dos materiais aludidos incorpora-se individualmente ao presente documento por referência na íntegra por seu ensinamento aludido.

[0248]Em suma, deve-se ter em mente que as modalidades da invenção reveladas neste documento são ilustrativas dos princípios da presente invenção. Outras modificações que podem ser empregadas encontram-se dentro do âmbito da invenção. Sendo assim, à guisa de exemplo, mas sem limitação, configurações alternativas da presente invenção podem ser utilizadas de acordo com os ensinamentos neste documento. Logo, a presente invenção não se limita precisamente à ilustrada e descrita.

[0249]As particularidades são ilustradas neste documento tão somente à guisa de exemplo e para fins de discussão ilustrativa das modalidades preferidas da presente invenção e são dadas para fins de oferecer o que, acredita-se, seja a

descrição mais útil e mais prontamente comprehensível dos princípios e aspectos conceituais de várias modalidades da invenção. Tendo isso em vista, não há a intenção de ilustrar detalhes estruturais da invenção em mais detalhes do que o necessário para a comprehensão fundamental da mesma, a descrição, tida junto com os desenhos e/ou exemplos, tornando manifesto aos versados na técnica como as várias formas da invenção podem ser concretizadas na prática.

[0250]As definições e explicações dadas na presente revelação destinam-se e visam a ser dominantes em qualquer interpretação futura, salvo quando modificadas clara e inequivocamente nos exemplos a seguir ou quando a aplicação do significado em questão tornar a interpretação sem sentido ou essencialmente sem sentido. Nos casos em que a interpretação de um termo torná-lo-ia sem sentido ou essencialmente sem sentido, a definição deve ser retirada do Dicionário Webster, 3^a edição, ou de um dicionário conhecido pelos versados na técnica, tal como o Dicionário Oxford de Bioquímica e Biologia Molecular (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para modificar geneticamente células B para que expressem o palivizumabe, o método sendo **CARACTERIZADO** por compreender introduzir na SEQ ID N°: 1 um constructo genético que compreende um promotor de cadeia pesada e sequências de ácido nucleico que codificam a cadeia leve completa do palivizumabe, um ligante Gly-Ser e a região variável da cadeia pesada do palivizumabe, manipulando geneticamente assim as células B para que expressem o palivizumabe.

2. Método para manipular geneticamente células B para que expressem um anticorpo selecionado, o método sendo **CARACTERIZADO** por compreender introduzir na SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3 ou SEQ ID N°: 4 um constructo genético que compreende ou que codifica (i) um promotor de cadeia pesada, (ii) um peptídeo de sinal, (iii) a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado; (iv) um ligante flexível ou um elemento saltador; (v) a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado; e (vi) uma junção de *splice*, manipulando geneticamente assim as células B para que expressem o anticorpo selecionado.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o genoma codificante de cadeia pesada variável endógeno nas células B não é extirpado durante a modificação genética.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-Vírus Sincicial Respiratório, um anticorpo anti-vírus da imunodeficiência humana (HIV), um anticorpo anti-vírus da Dengue, um anticorpo anti-*Bordetella pertussis*, um anticorpo anti-hepatite C, um anticorpo anti-vírus da influenza, um anticorpo anti-vírus da parainfluenza, um anticorpo anti-metapneumovírus (MPV), um anticorpo anti-citomegalovírus, um anticorpo anti-vírus Epstein Barr; um anticorpo anti-herpes-vírus simples, um

anticorpo anti-toxina bacteriana do *Clostridium difficile*, ou um anticorpo anti-fator de necrose tumoral (TNF).

5. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o constructo genético compreende a SEQ ID N°: 102-175, 278, 279 ou 280-289.

6. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível fica entre a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado e a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado.

7. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível é selecionado dentre as SEQ ID N°: 180-184.

8. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível é um ligante Gly-Ser que compreende de 50 a 80 aminoácidos.

9. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível é um ligante Gly-Ser que compreende 57 aminoácidos.

10. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível é de SEQ ID N°: 122.

11. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante saltador fica entre a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado e a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado.

12. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o elemento saltador é um peptídeo auto-clivante.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo auto-clivante é selecionado dentre as SEQ ID N°: 176-179.

14. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o elemento saltador é um sítio interno de entrada no ribossomo (IRES).

15. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o promotor de cadeia pesada é selecionado dentre as SEQ ID N°: 111 e 128.

16. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato

de que o promotor de cadeia pesada é IgVH1-69 ou J558H10.

17. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo de sinal é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 118, 134 e 185-194.

18. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo de sinal é derivado da cadeia pesada IgH humana ou da cadeia leve IgL humana.

19. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o constructo genético comprehende braços de homologia.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os braços de homologia comprehendem as SEQ ID Nº: 90-101, 110, 125, 127, 140, 142, 143, 153, 170, 171, 173, 174, 278 ou 279.

21. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o constructo genético codifica uma etiqueta.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etiqueta comprehende uma STREPTAG®, etiqueta STREP® II, etiqueta de His, etiqueta Flag, etiqueta Xpress, etiqueta Avi, etiqueta de calmodulina, etiqueta de poliglutamato, etiqueta de HA, etiqueta de Myc, etiqueta Nus, etiqueta S, etiqueta de SBP, Softag 1, Softag 3 ou etiqueta V5.

23. Método, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etiqueta comprehende a SEQ ID Nº: 122 ou 195-204.

24. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** por compreender ainda distribuir uma sequência de RNA guia (gRNA) selecionada dentre uma ou mais das SEQ ID Nº: 87-89 e 290-366 e uma nuclease às células B.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a distribuição se dá por eletroporação, por uma nanopartícula ou por distribuição mediada por vírus.

26. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato

de que o constructo genético faz parte de um vetor viral adeno-associado.

27. Método, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o gRNA e a nuclease são distribuídos por eletroporação e o constructo genético é distribuído como parte de um vetor viral adeno-associado.

28. Método, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a nuclease é Cas9 ou Cpf1.

29. Método, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma sequência alvo mirada por uma ou mais das sequências de gRNA é selecionada dentre uma ou mais das SEQ ID Nº: 5-84 e o gRNA é selecionado dentre uma ou mais das SEQ ID Nº: 87-89 e 290-366.

30. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-RSV que compreende palivizumabe, AB1128 ou ab20745.

31. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é: palivizumabe compreendendo uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 138 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 136; palivizumabe compreendendo uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 138 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 205; um anticorpo anti-RSV que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 123 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 120; ou um anticorpo anti-RSV que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 123 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 206.

32. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-RSV que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 207, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 208, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 209; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 210, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 211 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 212.

33. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato

de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que compreende 10E8, VRC01, ab18633 ou 39/5.4A.

34. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 150 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 149.

35. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 213, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 214, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 215, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 216, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 217 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 218, ou uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 219, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 220, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 221, uma CDRL1 com QYGS, uma CDRL2 com SGS e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 222.

36. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da Dengue que compreende o anticorpo 55, DB2-3, ab155042 ou ab80914.

37. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da Dengue que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 223, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 224, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 225; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 226, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 227 e uma CDRKL3 com a SEQ ID Nº: 228, ou uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 229, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 230, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 231, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 232, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 233 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 234.

38. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-coqueluche que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 235 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 236.

39. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-hepatite C que compreende MAB8694 ou C7-50.

40. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-hepatite C que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 237, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 238, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 239, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 240, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 241 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 242.

41. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que compreende C102.

42. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 159 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 158.

43. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 243, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 244, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 245, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 246, uma CDRL2 com KTS e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 247.

44. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-MPV que compreende MPE8.

45. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-CMV que compreende MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 ou LJP539.

46. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-EBV que compreende uma

cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 168 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 166.

47. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-EBV que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 248, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 249, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 250, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 251, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 252 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 253.

48. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HSV que compreende HSV8-N e MB66.

49. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-*Clostridium difficile* que compreende actoxumabe ou bezlotoxumabe.

50. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-TNF que compreende infliximabe, adalimumabe, etanercepte, certolizumabe, ou biossimilares aceitos dos mesmos.

51. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-TNF que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 254 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 255; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 256, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 257, e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 258; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 259, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 260 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 261; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 262, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 263 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 264; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 265, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 266 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 267; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 268, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 269 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 270; ou uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 271, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 272 e uma CDRL3

com a SEQ ID Nº: 273.

52. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação genética utiliza uma sequência que inclui qualquer uma das SEQ ID Nº: 87, 88, 89, 90-175, 278-366.

53. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula B é uma célula B produtora de anticorpos, uma célula B de memória, uma célula B virgem, uma célula B B1 ou uma célula B da zona marginal.

54. Célula B **CARACTERIZADA** por ser modificada de acordo com um método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 53.

55. Célula B, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula B é uma célula B secretora de anticorpos, uma célula B de memória, uma célula B virgem, uma célula B B1 ou uma célula B da zona marginal.

56. Método para produzir um efeito anti-infecção em um paciente que dele necessita, o método sendo **CARACTERIZADO** por compreender administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma célula B de acordo com a reivindicação 54 ao paciente, produzindo assim um efeito anti-infecção.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** por eliminar a necessidade de vacinação.

58. Método, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a administração substitui um protocolo de vacinação.

59. Método, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem sua imunidade suprimida.

60. Método, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem sua imunidade suprimida como parte de um regime de tratamento que compreende transplante de medula óssea, transplante de células-tronco hematopoiéticas ou administração de células-tronco hematopoiéticas geneticamente modificadas.

61. Método para produzir um efeito anti-inflamatório em um paciente que dele necessita, o método sendo **CARACTERIZADO** por compreender administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma célula B de acordo com a reivindicação 54 ao paciente, produzindo assim um efeito anti-inflamatório.

62. Constructo genético para modificar uma célula B para que expresse um anticorpo selecionado, o constructo genético sendo **CARACTERIZADO** por compreender ou codificar (i) um promotor de cadeia pesada, (ii) um peptídeo de sinal, (iii) a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado; (iv) um ligante flexível ou um elemento saltador; (v) a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado; e (vi) uma junção de *splice*.

63. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** por compreender as SEQ ID Nº: 102-175 ou 280-289.

64. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível fica entre a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado e a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado.

65. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 180-184.

66. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível é um ligante Gly-Ser que comprehende de 50 a 80 aminoácidos.

67. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível é um ligante Gly-Ser que comprehende 57 aminoácidos.

68. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante flexível é de SEQ ID Nº: 122.

69. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o elemento saltador fica entre a cadeia leve de comprimento total do anticorpo selecionado e a região variável da cadeia pesada do anticorpo selecionado.

70. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o elemento saltador é um peptídeo auto-clivante.

71. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 70,
CARACTERIZADO pelo fato de que o peptídeo auto-clivante é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 176-179.

72. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o elemento saltador é um sítio interno de entrada no ribossomo (IRES).

73. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o promotor de cadeia pesada é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 111 e 128.

74. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o promotor de cadeia pesada é IgVH1-69 ou J558H10.

75. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o peptídeo de sinal é selecionado dentre as SEQ ID Nº: 118, 134 e 185-194.

76. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o peptídeo de sinal é derivado da cadeia pesada IgH humana ou da cadeia leve IgL humana.

77. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO por compreender braços de homologia.

78. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 77,
CARACTERIZADO pelo fato de que os braços de homologia compreendem as SEQ ID Nº: 90-101, 110, 125, 127, 140, 142, 143, 153, 170, 171, 173, 174, 278 ou 279.

79. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO por codificar uma etiqueta.

80. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 79,
CARACTERIZADO pelo fato de que a etiqueta compreende uma STREPTAG®, etiqueta STREP® II, etiqueta de His, etiqueta Flag, etiqueta Xpress, etiqueta Avi, etiqueta de calmodulina, etiqueta de poliglutamato, etiqueta de HA, etiqueta de Myc, etiqueta Nus, etiqueta S, etiqueta de SBP, Softag 1, Softag 3 ou etiqueta V5.

81. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 79,
CARACTERIZADO pelo fato de que a etiqueta compreende a SEQ ID Nº: 122 ou 195-204.

82. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-RSV que compreende palivizumabe, AB1128 ou ab20745.

83. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o anticorpo selecionado é: palivizumabe compreendendo uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 138 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 136; palivizumabe compreendendo uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 138 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 205; um anticorpo anti-RSV que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 123 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 120; ou um anticorpo anti-RSV que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 123 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 206.

84. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62,
CARACTERIZADO pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-RSV que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 207, uma CDRH2 com a SEQ

ID Nº: 208, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 209; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 210, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 211 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 212.

85. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que compreende 10E8, VRC01, ab18633 ou 39/5.4A.

86. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 150 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 149.

87. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HIV que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 213, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 214, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 215, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 216, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 217, e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 218, ou uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 219, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 220, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 221, uma CDRL1 com QYGS, uma CDRL2 com SGS e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 222.

88. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da Dengue que compreende o anticorpo 55, DB2-3, ab155042 ou ab80914.

89. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da Dengue que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 223, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 224, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 225; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 226, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 227, e uma CDRKL3 com a SEQ ID Nº: 228, ou uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 229, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 230, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 231, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 232, uma

CDRL2 com a SEQ ID Nº: 233 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 234.

90. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-coqueluche que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 235 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 236.

91. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-hepatite C que compreende MAB8694 ou C7-50.

92. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-hepatite C que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 237, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 238, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 239, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 240, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 241 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 242.

93. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que compreende C102.

94. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que compreende uma cadeia pesada com a SEQ ID Nº: 159 e uma cadeia leve com a SEQ ID Nº: 158.

95. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-vírus da influenza que compreende uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 243, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 244, uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 245, uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 246, uma CDRL2 com KTS e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 247.

96. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-

MPV que comprehende MPE8.

97. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-CMV que comprehende MCMV5322A, MCMV3068A, LJP538 ou LJP539.

98. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-EBV que comprehende uma cadeia pesada com a SEQ ID N°: 168 e uma cadeia leve com a SEQ ID N°: 166.

99. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-EBV que comprehende uma CDRH1 com a SEQ ID N°: 248, uma CDRH2 com a SEQ ID N°: 249, uma CDRH3 com a SEQ ID N°: 250, uma CDRL1 com a SEQ ID N°: 251, uma CDRL2 com a SEQ ID N°: 252 e uma CDRL3 com a SEQ ID N°: 253.

100. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-HSV que comprehende HSV8-N e MB66.

101. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-*Clostridium difficile* que comprehende actoxumabe ou bezlotoxumabe.

102. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-TNF que comprehende infliximabe, adalimumabe, etanercepte, certolizumabe, ou biossimilares aceitos dos mesmos.

103. Constructo genético, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo selecionado é um anticorpo anti-TNF que comprehende uma cadeia pesada com a SEQ ID N°: 254 e uma cadeia leve com a SEQ ID N°: 255; uma CDRH1 com a SEQ ID N°: 256, uma CDRH2 com a

SEQ ID Nº: 257 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 258; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 259, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 260 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 261; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 262, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 263 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 264; uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 265, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 266 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 267; uma CDRH1 com a SEQ ID Nº: 268, uma CDRH2 com a SEQ ID Nº: 269 e uma CDRH3 com a SEQ ID Nº: 270; ou uma CDRL1 com a SEQ ID Nº: 271, uma CDRL2 com a SEQ ID Nº: 272 e uma CDRL3 com a SEQ ID Nº: 273.

104. Kit para modificar geneticamente uma célula B, o kit sendo **CARACTERIZADO** por compreender um constructo genético de acordo com qualquer uma das reivindicações de 62 a 103 e um gRNA que mira a SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 ou SEQ ID Nº: 4.

105. Kit, de acordo com a reivindicação 104, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o gRNA é selecionado dentre uma ou mais das SEQ ID Nº: 87, 88, 89 e 290-366.

106. Kit, de acordo com a reivindicação 104, **CARACTERIZADO** por compreender ainda uma nuclease.

107. Kit, de acordo com a reivindicação 106, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a nuclease é Cas9 ou Cpf1.

108. Kit, de acordo com a reivindicação 104, **CARACTERIZADO** por compreender ainda uma nanopartícula ou vetor viral adeno-associado.

109. Kit, de acordo com a reivindicação 106, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o gRNA e a nuclease são associados a uma nanopartícula.

110. Kit, de acordo com a reivindicação 104, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o constructo genético faz parte de um vetor viral adeno-associado.

FIG. 1

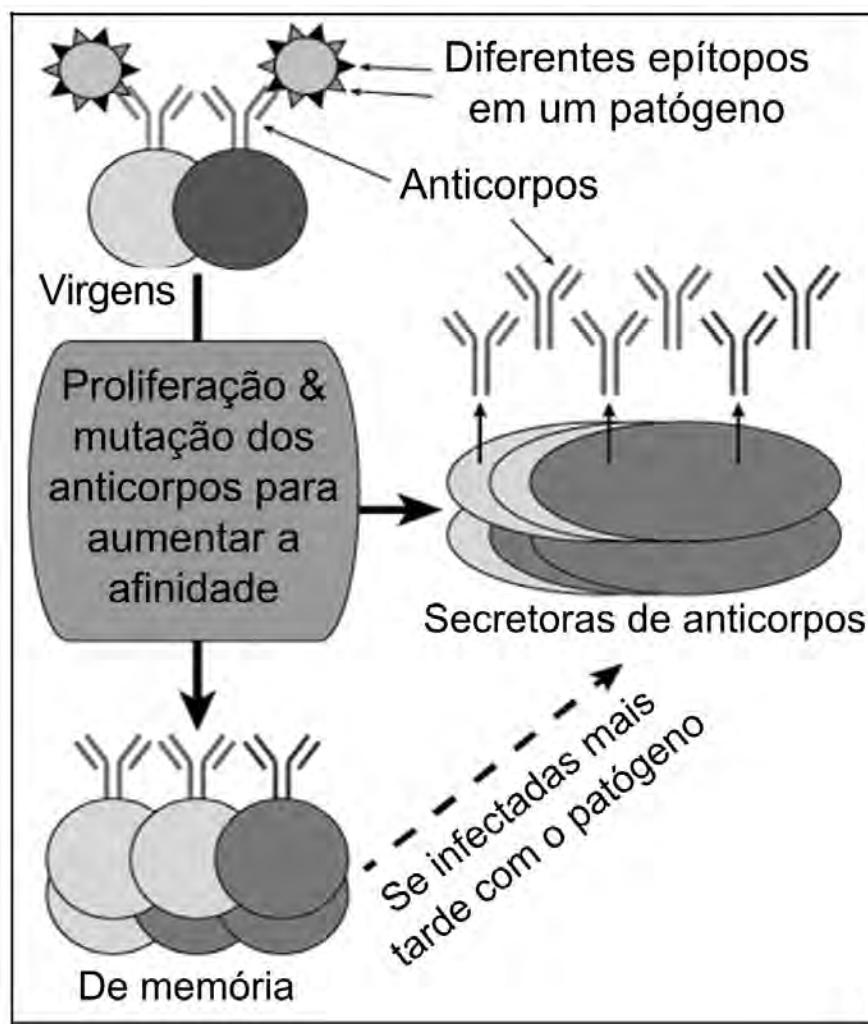


FIG. 2A

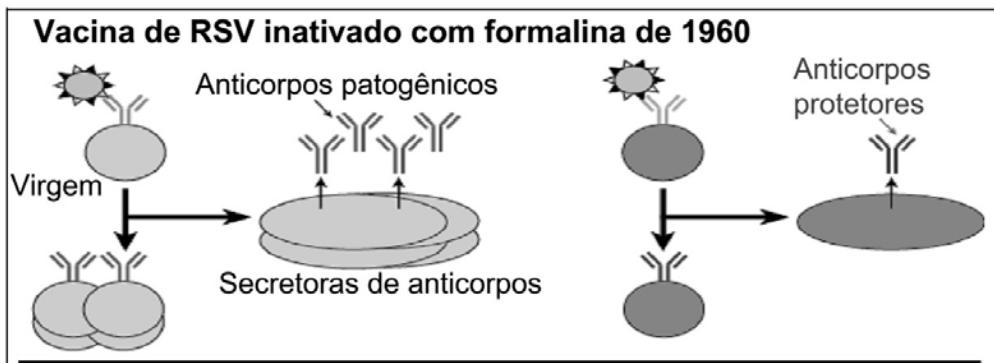


FIG. 2B

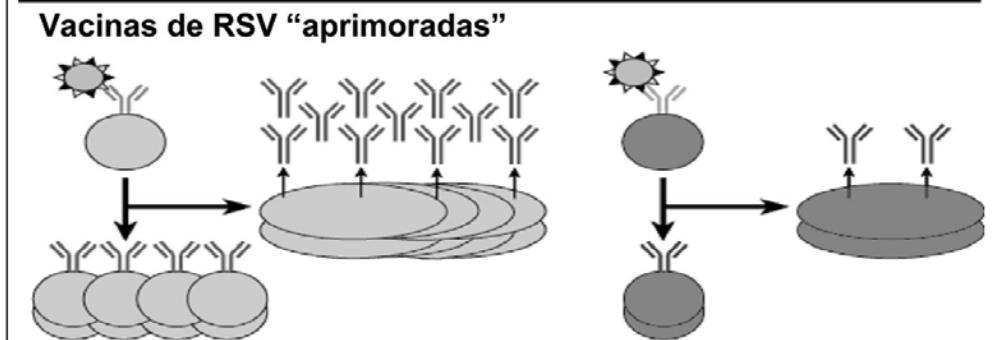


FIG. 2C



FIG. 3A

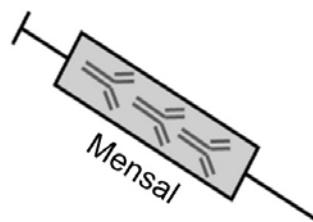
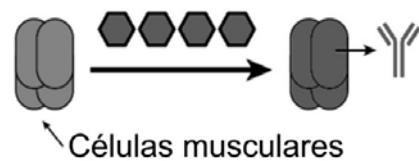
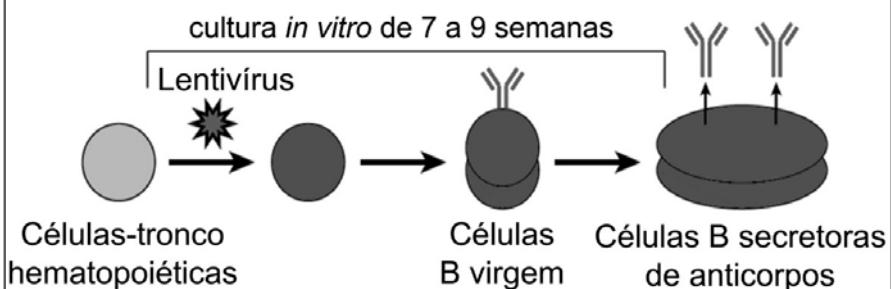
Injeção de Palivizumabe**Expressão de Palivizumabe mediada por adenovírus**

FIG. 3B

FIG. 3C

Engenharia e diferenciação genética de células-tronco

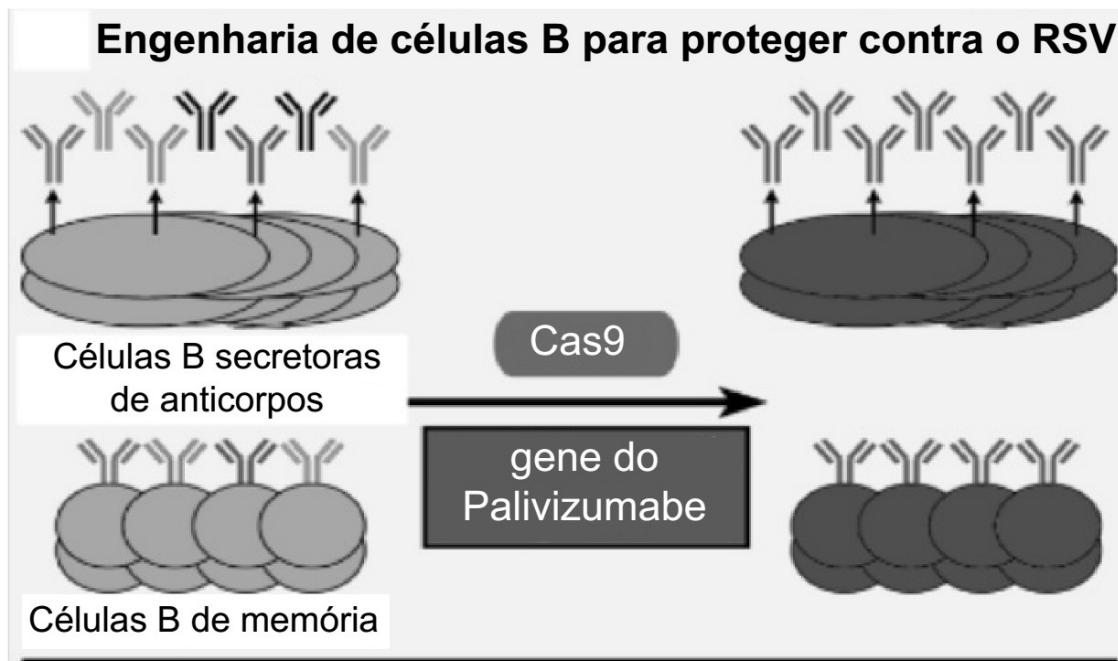
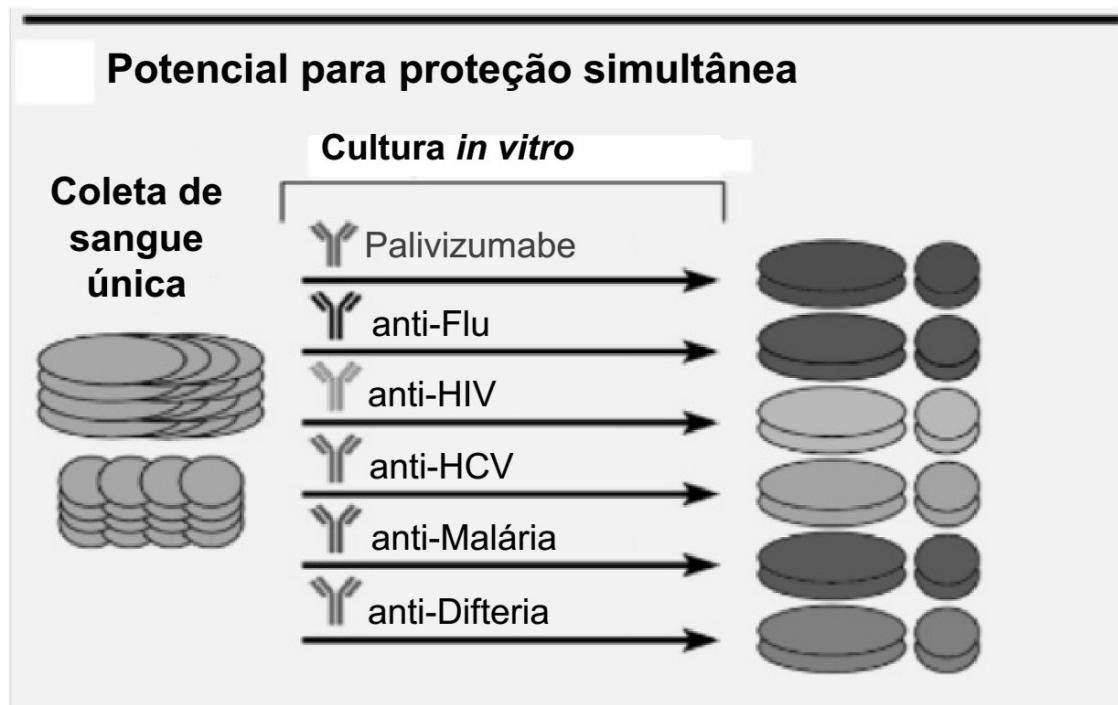


FIG. 4B



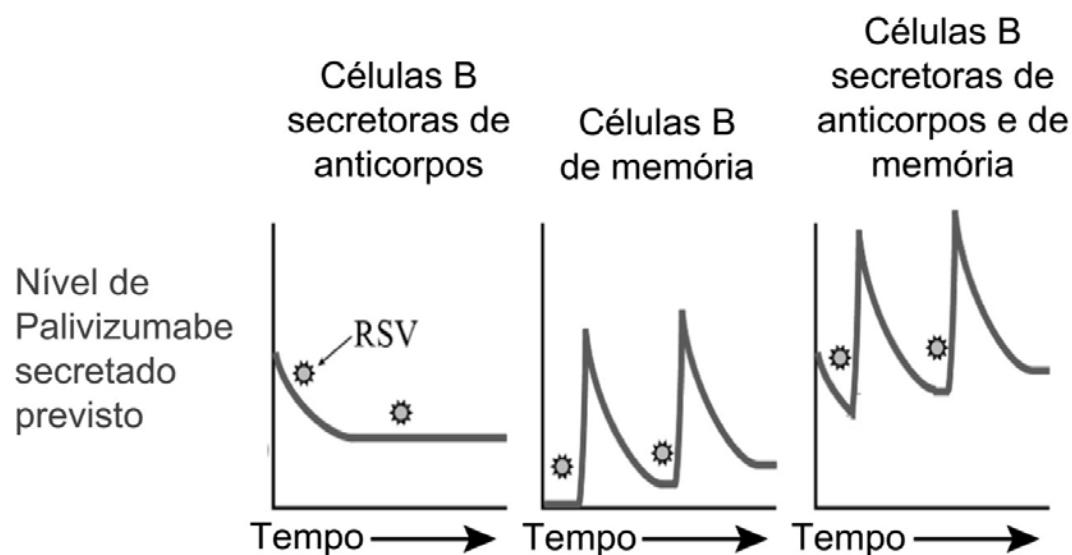


FIG. 6A

Genes de anticorpo



FIG. 6B

Proteínas de anticorpo

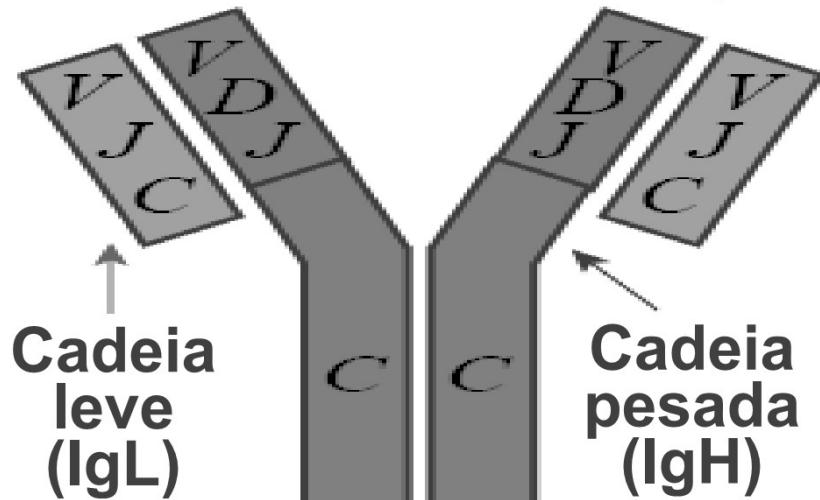


FIG. 7

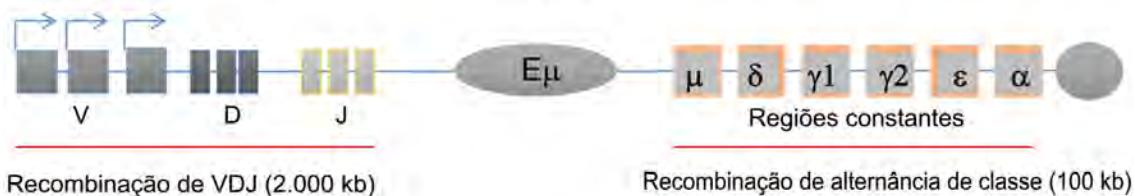


FIG. 8A

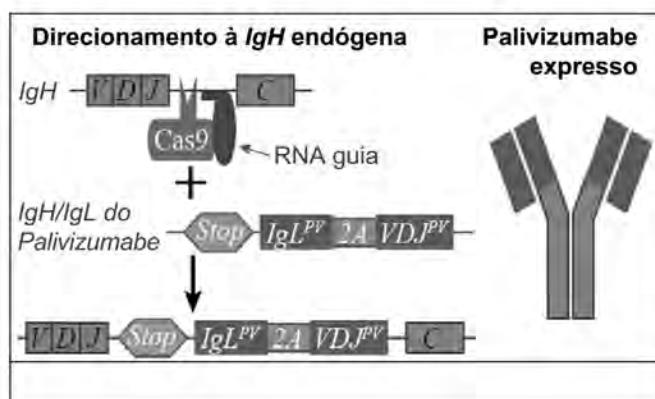


FIG. 8B

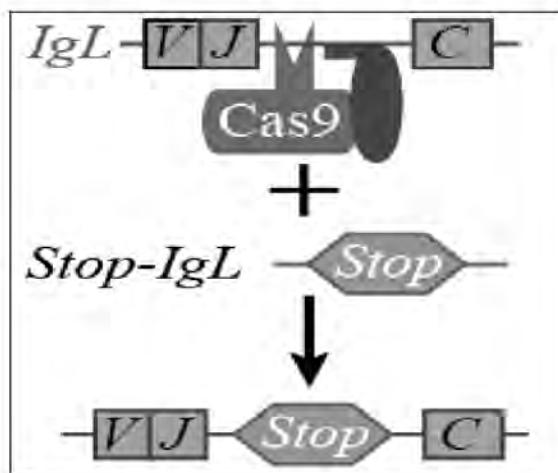


FIG. 9

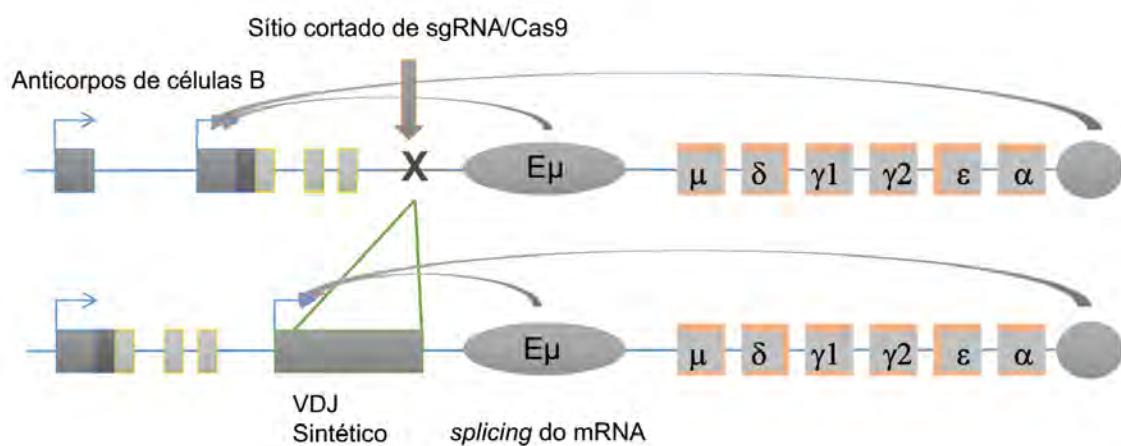


FIG. 10

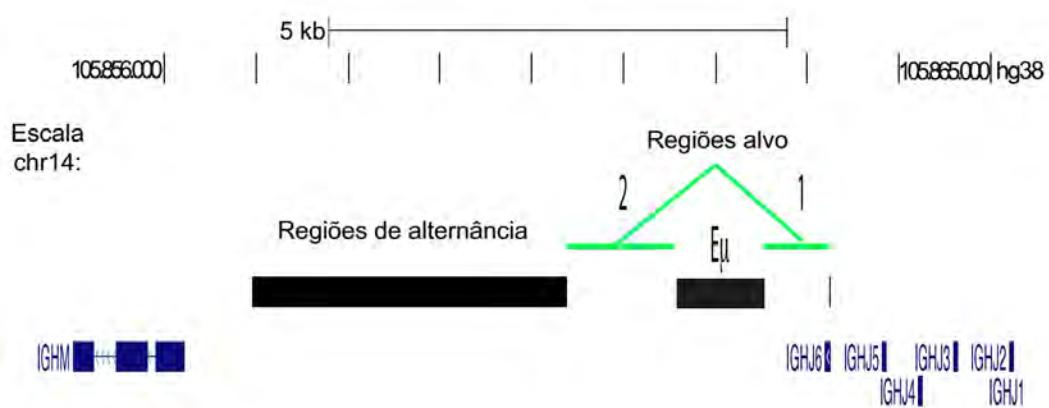


FIG. 11A

Sequência do intensificador intrônico E μ humano:

GTAGTTGAAAAGTGGTCTTGAAAAACTAAAATGAAGGCCACTCTATCAGAATA
 TCAAAGTGGTCTCCTTAATCACAAAGAGAAAACGAGTTAACCTAAAAAGATTGT
 GAACACAGTCATTATGAAAATAATGCTCTGAGGTATCGAAAAAGTATTGAGATT
 AATTATCACATGAAGGGATAACAAAGCTAATTAAAAACTTTGAATACAGTCAT
 AAACTCTCCCTAAGACTGTTAATTCTTAAACATCTTACTTTAAAATGAATGCA
 GTTAGAAGTTGATATGCTGTTGCACAAACTAGCAGTTGATAAGCTAAGATTGG
 AAATGAAATTCAAGATAGTTAAAAAAAGCCTTTCAGTTCGGTAGCCTCGCCTT
 ATTTAGAAACGCAAATTGCCAGGTGTTGCTCAGTAGAGCACTTCAGA
 TCTGGGCCTGGGCAAACCCACCTCTTCACAACCAGAAGTGATAAATTACCAATT
 GTGTTTTTGCTCCTAAAATAGACTCTCGCGGTGACCTGCTTCCTGCCACCTG
 CTGTGGGTGCCGGAGACCCCCATGCAGCCATCTGACTCTAATTCATCATCTGC
 TTCCAGCTCGCTCAATTAAATTAAAAAAACTGATTATGATGGTCAAAACG
 CAGTCCCAGCATGGGGCCGACAGCACTGTGCTAGTATTCTTAGCTGAGCTTGC
 TTTGGCCTCAATTCCAGACACATACTCATGGGTGTTAACAAATGATAAGAA
 TTTCAAATACTGGACAGTTAAAAAAATTAATATACTTGAAAATCTCACATT
 AAGTCA (SEQ ID Nº: 85)

Região intrônica humana 1 a mirar para a introdução do constructo genético:

CTACATGGACGTCTGGGCAAAGGGACCACGGTACCGTCTCCTCAGGTAAGA
 ATGGCCACTCTAGGGCCTTGTGCTACTGCCGTGGGTTCTGAGCA
 TTGCAGGTTGGCCTCGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGCGGACTGGCCA
 GGAGGGGATGGGACTGGGGTGCGCTTGAGGATCTGGGAGCCTCTGTTGGATT
 CCGATGCCCTTGGAAAATGGACTCAGGTTGGGTGCGTCTGATGGAGTAAC
 AGCCTGGGGCTGGGAGCCACATTGGACGAGATGCCGAACAAACCAAGGG
 GTCTTAGTGTGATGGCTGAGGAATGTGCTCAGGAGCGGTGCTGTAGGACTGCA
 AGATCGCTGCACAGCAGCGAACATGTGAAATATTCTTCTTGAATTATGAGGTG
 GCTGTGTGTCACCTGCATCTTAAATTCTTATTGGCTGGAAAGAGAACTGTCGG
 AGTGGGTGAATCCAGCCAGGAGGGACGCGTAGCCCCGGTCTGATGAGAGCA
 GGGTTGGGGCAGGGTAGCCCAGAAACGGTGGCTGCCGCTGACAGGGC
 TTAGGGAGGCTCCAGGACCTCAGTGCCTGAAGCTGGTTCCATGAGAAAAGG
 ATTGTTATCTTAGGAGGCATGCTACTGTTAAAAGACAGGATATGTTGAAGTG
 GCTTCTGAGAAAATGGTTAACAGAAAATTAT (SEQ ID Nº: 1)

FIG. 11B

Human_Region_1_gRNA_1	GGTCCTCGGGGCATGTTCC <u>GAGG</u> (SEQ ID N°: 5)
Human_Region_1_gRNA_2	GGGCATGTTCCGAGGGGAC <u>CTGG</u> (SEQ ID N°: 6)
Human_Region_1_gRNA_3	GCATTGCAGGTTGGCCTC <u>GGGG</u> (SEQ ID N°: 7)
Human_Region_1_gRNA_4	TCCTCGGGGCATGTTCC <u>GAGGGG</u> (SEQ ID N°: 8)
Human_Region_1_gRNA_5	GGCATGTTCCGAGGGGAC <u>CTGGG</u> (SEQ ID N°: 9)
Human_Region_1_gRNA_6	GTCTCAGGAGCGGTGT <u>CTGTAGG</u> (SEQ ID N°: 10)
Human_Region_1_gRNA_7	AGCATTGCAGGTTGGCCTC <u>GGG</u> (SEQ ID N°: 11)
Human_Region_1_gRNA_8	CCTGGGCGGACTGCC <u>CAGGAGGG</u> (SEQ ID N°: 12)
Human_Region_1_gRNA_9	ACTGGGGTGC <u>CTTGAGGATCTGG</u> (SEQ ID N°: 13)
Human_Region_1_gRNA_10	CCCCAGTGCCC <u>ATCCCCTCCTGG</u> (SEQ ID N°: 14)
Human_Region_1_gRNA_11	CTAAGACCC <u>CTGGTTGTCAGG</u> (SEQ ID N°: 15)
Human_Region_1_gRNA_12	TGTGGATTTCCGATGC <u>CTTGG</u> (SEQ ID N°: 16)
Human_Region_1_gRNA_13	AGGACCAAC <u>CTGCAATGCTCAGG</u> (SEQ ID N°: 17)
Human_Region_1_gRNA_14	CTCAGGTTGGGTGC <u>GTCTGATGG</u> (SEQ ID N°: 18)
Human_Region_1_gRNA_15	CCCTCCTGCC <u>AGTCCGCCAGG</u> (SEQ ID N°: 19)
Human_Region_1_gRNA_16	GGCCAGGAGGGGATGGG <u>CACTGG</u> (SEQ ID N°: 20)
Human_Region_1_gRNA_17	GAGATGCCTGAACAA <u>ACCAGGGG</u> (SEQ ID N°: 21)
Human_Region_1_gRNA_18	AGGGGTCTTAGT <u>GATGGCTGAGG</u> (SEQ ID N°: 22)
Human_Region_1_gRNA_19	ATGGGC <u>ACTGGGGTGCCTTGAGG</u> (SEQ ID N°: 23)
Human_Region_1_gRNA_20	TTCCGATGC <u>CTTGGAAAATGGG</u> (SEQ ID N°: 24)

FIG. 11B (continuação)

Human _1_gRNA_1	GGUCCUCGGGGCAUGUUCCG (SEQ ID Nº: 290)
Human _1_gRNA_2	GGGCAUGUUCCGAGGGGACC (SEQ ID Nº: 291)
Human _1_gRNA_3	GCAUUGCAGGUUGGUCCUCG (SEQ ID Nº: 88)
Human _1_gRNA_4	UCCUCGGGGCAUGUUCCGAG (SEQ ID Nº: 292)
Human _1_gRNA_5	GGCAUGUUCCGAGGGGACCU (SEQ ID Nº: 293)
Human _1_gRNA_6	GUCUCAGGAGCGGUGUCUGU (SEQ ID Nº: 89)
Human _1_gRNA_7	AGCAUUGCAGGUUGGUCCUC (SEQ ID Nº: 294)
Human _1_gRNA_8	CCUGGGCggACUGGCCAGGA (SEQ ID Nº: 295)
Human _1_gRNA_9	ACUGGGGUGCCUUGAGGAUC (SEQ ID Nº: 296)
Human _1_gRNA_10	CCCCAGUGCCCAUCCCCUCC (SEQ ID Nº: 297)
Human _1_gRNA_11	CUAAGACCCCUGGUUUGUUC (SEQ ID Nº: 298)
Human _1_gRNA_12	UGUGGAUUUUCCGAUGCCUU (SEQ ID Nº: 299)
Human _1_gRNA_13	AGGACCAACCUGCAAUGCUC (SEQ ID Nº: 300)
Human _1_gRNA_14	CUCAGGUUGGGUGCGUCUGA (SEQ ID Nº: 301)
Human _1_gRNA_15	CCCUCCUGGCCAGUCCGCC (SEQ ID Nº: 302)
Human _1_gRNA_16	GGCCAGGAGGGGAUGGGCAC (SEQ ID Nº: 303)
Human _1_gRNA_17	GAGAUGCCUGAACAAACCAG (SEQ ID Nº: 304)
Human _1_gRNA_18	AGGGGUCUUAGUGAUGGCUG (SEQ ID Nº: 305)
Human _1_gRNA_19	AUGGGCACUGGGUGCCUUG (SEQ ID Nº: 306)
Human _1_gRNA_20	UUCCGAUGCCUUUGGAAAAAU (SEQ ID Nº: 307)

FIG. 12A

Região intrônica humana 2 a mirar para a introdução do constructo genético:

CTCACTTTAGGATAAGTTTAGGTAAAATGTGCATCATTATCCTGAATTATTCAG
 TTAAGCATGTTAGTGGTGGCATAAGAGAAAACCAATCAGATAGTGCTGAAGA
 CAGGACTGTGGAGACACCTAGAAGGACAGATTCTGTTCCGAATCACCGATGCG
 GCGTCAGCAGGACTGGCCTAGCGGAGGCTCTGGGAGGGTGGCTGCCAGGCC
 GGCTGGGCTTGGTCTCCCCGGACTACCCAGAGCTGGATGCGTGGCTTCT
 GCTGCCGGGCCACTGGCTGCTCAGGCCAGGCCCTGTTAATGGACTTGGAG
 GAATGATCCATGCCAAAGCTTGCAAGGCTCGCAGTGACCAGGCCCGACA
 TGGTAAGAGACAGGCAGCCGCCGCTGCTGCATTGCTTCTTAAACTTGT
 TTTGACGTCTTATTCCACTAGAAGGGAACTGGCTTAATTGCTTGATGAAGAG
 CAGGAGACTCATTATGTGAGTCTTGAGTGACCATTGCTGGTCACTCCC
 TTAACCTTCCCTAAAGCCCATTGAAGGAGAGGTGCACGAGCTGCTCCAC
 CTCTGAATGGGATGGCATGGTAATGATGCTTGAGAACATACCAAGCCCC
 GGCATGCCCTGCTAAGTCATTGACTGTAGGTCAATCGCACCCCTGAAAG
 TAGCCCATGCCCTCAAAGCGATTATGGTAAATGGCAGAATTAAAGTGGCAA
 TTCAGATAAAATGCATTCTGGTTGTTCCAATGATGACTGTTATCTAGAGGG
 ATTTAAAGGCAGGGGTTACTGCAGACTCAGAAGGGAGGGATGCTCCGGAA
 GGTGGAGGCTCTGAGCATCTCAATACCCTCCTTGGTGCAGAACATGCTG
 CACTCTAGAGCAAGGGACCTGCTCATTTTATCACAGCACAGGCTCCTAA
 CTTGGTCTCATTCTCAAGATGTTTAATGACTTAAAGCAGCAAAGAAATATT
 CCCAGGTAGTGGAGGGTGTAAATGATTGGTAAATGCTTGGAACCAAA
 GTGGCGCTGGGCAGGACTGCAGGGAACTGGGTATCAAGTAGAGGGAGACA
 AAAGATGGAAGCCAGCCTGGCTGTGCAGGAACCCGGCAATGAGATGGCTT
 CTGAGACAAGCAGGTCTGGTGGCTGACCATTCTGGCCATGACA
 AGCTTCAGAAATGGACTCAGATGGCAAAACTGACCTAAGCTGACCTAGACT
 AACAGGCTGAAC (SEQ ID Nº: 2)

FIG. 12B

Human_region2_gRNA_1	CTGACGCCGCATCGGTGATT <u>CGG</u> (SEQ ID Nº: 25)
Human_region2_gRNA_2	TTAGACAAGGGCGATGCCAG <u>TGG</u> (SEQ ID Nº: 26)
Human_region2_gRNA_3	CGTGCACCTCTCCTCAA <u>ATGG</u> (SEQ ID Nº: 27)
Human_region2_gRNA_4	AGCATATCTTCTGCACCAAG <u>AGGG</u> (SEQ ID Nº: 28)
Human_region2_gRNA_5	ATATTCCACCCAGGTAG <u>TGGAGGG</u> (SEQ ID Nº: 29)
Human_region2_gRNA_6	GTGCGACCTCTCCTCAA <u>ATGGG</u> (SEQ ID Nº: 30)
Human_region2_gRNA_7	AGGTCCCCTTGCTCTAGAAG <u>TGG</u> (SEQ ID Nº: 31)
Human_region2_gRNA_8	CTCTAGATAACAGTCATCATT <u>GG</u> (SEQ ID Nº: 32)
Human_region2_gRNA_9	TTGTCTAACGTCATTGACT <u>GTAAGG</u> (SEQ ID Nº: 33)
Human_region2_gRNA_10	CCAAAGCGATTATGGTAA <u>ATGG</u> (SEQ ID Nº: 34)
Human_region2_gRNA_11	TCTTTGAGTGACCATTGT <u>CTGG</u> (SEQ ID Nº: 35)
Human_region2_gRNA_12	CCATTACCATAAATCGCTT <u>GG</u> (SEQ ID Nº: 36)
Human_region2_gRNA_13	AGGGCGATGCCAGTGGGGCT <u>GG</u> (SEQ ID Nº: 37)
Human_region2_gRNA_14	AGCTAAAGCCATCTCATTGCC <u>GG</u> (SEQ ID Nº: 38)
Human_region2_gRNA_15	CCACAACCTCTGAATGGGG <u>ATGG</u> (SEQ ID Nº: 39)
Human_region2_gRNA_16	TTAATTGCTTGATGAAGAG <u>GCAGG</u> (SEQ ID Nº: 40)
Human_region2_gRNA_17	TAGACAAGGGCGATGCCAG <u>TGGG</u> (SEQ ID Nº: 41)
Human_region2_gRNA_18	AAGCTGACCTAGACTAAAC <u>AAAGG</u> (SEQ ID Nº: 42)
Human_region2_gRNA_19	GCAGGAACCCGGCAATGAG <u>ATGG</u> (SEQ ID Nº: 43)
Human_region2_gRNA_20	TCTGTTCCGAATCACCGAT <u>GC GG</u> (SEQ ID Nº: 44)

FIG. 12B (continuação)

Human_2_gRNA_1	CUGACGCCGCAUCGGUGAUU (SEQ ID Nº: 308)
Human_2_gRNA_2	UUAGACAAGGGCGAUGCAG (SEQ ID Nº: 309)
Human_2_gRNA_3	CGUGCGACCUCUCCUCAAA (SEQ ID Nº: 310)
Human_2_gRNA_4	AGCAUAUCUUCUGCACCAAG (SEQ ID Nº: 311)
Human_2_gRNA_5	AUAUUCACCCAGGUAGUGG (SEQ ID Nº: 312)
Human_2_gRNA_6	GUGCGACCUCUCCUCAAAU (SEQ ID Nº: 313)
Human_2_gRNA_7	AGGUCCCCUUGCUCUAGAAAG (SEQ ID Nº: 314)
Human_2_gRNA_8	CUCUAGAUAAACAGUCAUCAU (SEQ ID Nº: 315)
Human_2_gRNA_9	UUGUCUAAGUCAUUGACUGU (SEQ ID Nº: 316)
Human_2_gRNA_10	CCAAAGCGAUUAUGGUAAA (SEQ ID Nº: 317)
Human_2_gRNA_11	UCUUUUGAGUGACCAUUGUC (SEQ ID Nº: 318)
Human_2_gRNA_12	CCAUUUACCAUAAAUCGCUU (SEQ ID Nº: 319)
Human_2_gRNA_13	AGGGCGAUGCAGUGGGCU (SEQ ID Nº: 320)
Human_2_gRNA_14	AGCUAAAGCCAUCUCAUUGC (SEQ ID Nº: 321)
Human_2_gRNA_15	CCACAACCUCUGAAUGGGGA (SEQ ID Nº: 322)
Human_2_gRNA_16	UUAUUUGCUUGAUGAAGAGC (SEQ ID Nº: 323)
Human_2_gRNA_17	UAGACAAGGGCGAUGCCAGU (SEQ ID Nº: 324)
Human_2_gRNA_18	AAGCUGACCUAGACUAAACA (SEQ ID Nº: 325)
Human_2_gRNA_19	GCAGGAACCCGGCAAUGAGA (SEQ ID Nº: 326)
Human_2_gRNA_20	UCUGUUCCGAAUCACCGAUG (SEQ ID Nº: 327)

FIG. 13A

Sequência do intensificador intrônico E μ murídeo:

```

AGTCTAGATAATTGCATTCACTTAAAAAAAGTCTTCTCCTAAAATGAATACTC
AGAAAGTGGTCTGAAAAAGATTGTGAAGCCGTTGACCAGAATGTCAGACTC
TTAATAGTAAGGCAAAACAACACTAAAAAGATCATGAACAAAGTCAGTGAA
ATGCTTCGGGTATTGGAAAAGATTGAATGGAGACCAATAATCAGAGGGAGAA
TAATAGAGTAATTTAAGAACAGTTCTAAATATATTAGAAATTAAAGACACTAAAG
TCCTCAATTCTTACATAACCTAACCTAACCTGAAAATGAATTCTAAATACATTAGAA
GTCGATAAACTTAAGTTGGGGAACTAGAACACTCAAGCTAAAATTAAAGGT
TGAACACTAATAAGTTAAAGAGGACCTCTCAGTTCTGGCTGAATCCTCAACTTA
TTTAGAAATGCAAATTACCCAGGTGGTGTGCTCAGCCTGGACTTCGGTT
GGTGGGGCTGGACAGAGTGTGTTCAAAACCACTTCTCAAACCCACAGCTACAAGT
TTACCTAGTGGTTTATTTCCCTCCCCAAATGCCTGCCACATGACCTGCTT
CCTGCCAGCTGCTGCAGGTGTTCTGGTCTGATCGGCCATCTGACTCCAACCTC
AACATTGCTCAATTCAATTAAAAATATTGAAACTTAATTATTATTGTTAAAGTC
AGTTCTGAATAGGTTATGAGAGAGCCTCACTCCCATTCTCGGTTAAACTTAAG
TAATATCAGTTCTACACAAACAAGACCTCAAACGATTGACAAAGAATTGGACA
TTTAAAAAAATGAGTACTTGAAAACCCCTCTCACATTAAAGTCACAGTATTTAAC
TATTTCTCTAGGAACCAACTTAAGAGTAAAAGCAACATCTCTAATATTCCATAC
ACATACTCTGTGTTCTTGAAAGCTGGACTTTGCAGGCTCCACCAGACCTCT
CTAGACA (SEQ ID N°: 86)

```

Região intrônica murídea 1 a mirar para a introdução do constructo genético:

```

GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCC
TCTCCAGGTCTTATTTAACCTTGTGTTATGGAGTTCTGAGCATTGCAGACTA
ATCTTGGATATTGTCCTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAAGTTGGAAATAAAACT
GTCTAGGGATCTCAGAGCCTTCTGAGGACAGATTATCTCCACATCTTGAAAAACTA
AGAATCTGTGTGATGGTGGAGTCCCTGGATGATGGATAGGGACTTTG
GAGGCTCATTGAAGAAGATGCTAAAACAATCCTATGGCTGGAGGGATAGTTGG
GGCTGTAGTTGGAGATTTCTGAGTTCTGAGGAAATAAAAGTATTAGTTGTGGAATATA
CTTCAGGACCACCTCTGTGACAGCATTACAGTATCCGATGCATAGGGACAA
AGAGTGGAGTGGGCACCTTCTTAGATTTGTGAGGAAATGTTCCGCACTAGATT
GTTAAAACCTCATTGTTGGAAGGAGAGCTGTCTAGTGATTGAGTCAAGGGA
GAAAGGCATCTAGCCTCGGTCTAAAAGGGTAGTTGCTG (SEQ ID N°: 3)

```

FIG. 13B

Mouse_Region_1_gRNA_1	CAACTACCCTTTGAGACCGAGG (SEQ ID N°: 45)
Mouse_Region_1_gRNA_2	TTATACAGTATCCGATGCATA <u>GG</u> (SEQ ID N°: 46)
Mouse_Region_1_gRNA_3	TATA <u>CAGTATCCGATGCATA</u> GGG (SEQ ID N°: 47)
Mouse_Region_1_gRNA_4	CATCTAGCCTCGGTCTCAA <u>AGG</u> (SEQ ID N°: 48)
Mouse_Region_1_gRNA_5	CACTCTTGTC <u>CCCTATGCAT</u> CGG (SEQ ID N°: 49)
Mouse_Region_1_gRNA_6	ATCTAGCCTCGGTCTCAA <u>AGG</u> (SEQ ID N°: 50)
Mouse_Region_1_gRNA_7	AAGTTTAAACAATCTAGT <u>GC</u> GG (SEQ ID N°: 51)
Mouse_Region_1_gRNA_8	AAGATGCTAAA <u>ACAATCCTA</u> TGG (SEQ ID N°: 52)
Mouse_Region_1_gRNA_9	TGCTAAA <u>ACAATCCTA</u> TGG (SEQ ID N°: 53)
Mouse_Region_1_gRNA_10	AAGTC <u>CCCTATCCC</u> CATCCAGG (SEQ ID N°: 54)
Mouse_Region_1_gRNA_11	GGGAGAA <u>AGGCATCTGC</u> CTCGG (SEQ ID N°: 55)
Mouse_Region_1_gRNA_12	TGAGCATTGC <u>AGACTAATCT</u> GG (SEQ ID N°: 56)
Mouse_Region_1_gRNA_13	TTAGTTGTGGAA <u>TATACTTC</u> AGG (SEQ ID N°: 57)
Mouse_Region_1_gRNA_14	TGGTGGAG <u>TCCCTGGATGAT</u> GGG (SEQ ID N°: 58)
Mouse_Region_1_gRNA_15	GTGGAGATA <u>ATCTGCCTAA</u> AGG (SEQ ID N°: 59)
Mouse_Region_1_gRNA_16	AGTCC <u>CTATCCC</u> CATCCAGG (SEQ ID N°: 60)
Mouse_Region_1_gRNA_17	ATCTTG <u>GATATTGTC</u> CCCTGAGG (SEQ ID N°: 61)
Mouse_Region_1_gRNA_18	GGGATAGT <u>TTGGGCTGTAG</u> TTGG (SEQ ID N°: 62)
Mouse_Region_1_gRNA_19	CAGGTAAGA <u>ATGGCCTCTCC</u> AGG (SEQ ID N°: 63)
Mouse_Region_1_gRNA_20	TCTCT <u>CAGGCCGGCTCC</u> CTCAGG (SEQ ID N°: 64)

FIG. 13B (continuação)

Mouse_1_gRNA_1	CAACUACCCUUUUGAGACCG (SEQ ID Nº: 328)
Mouse_1_gRNA_2	UUAUACAGUAUCCGAUGCAU (SEQ ID Nº: 87)
Mouse_1_gRNA_3	UAUACAGUAUCCGAUGCAUA (SEQ ID Nº: 329)
Mouse_1_gRNA_4	CAUCUAGCCUCGGUCUAAA (SEQ ID Nº: 330)
Mouse_1_gRNA_5	CACUCUUUGUCCCUAUGCAU (SEQ ID Nº: 331)
Mouse_1_gRNA_6	AUCUAGCCUCGGUCUAAAAA (SEQ ID Nº: 332)
Mouse_1_gRNA_7	AAGUUUUAAACAAUCUAGUG (SEQ ID Nº: 333)
Mouse_1_gRNA_8	AAGAUGCUCAAAACAAUCCUA (SEQ ID Nº: 334)
Mouse_1_gRNA_9	UGCUAAAACAAUCCUAUGGC (SEQ ID Nº: 335)
Mouse_1_gRNA_10	AAGUCCCUAUCCCAUCAUCC (SEQ ID Nº: 336)
Mouse_1_gRNA_11	GGGAGAAAGGCAUCUAGCCU (SEQ ID Nº: 337)
Mouse_1_gRNA_12	UGAGCAUUGCAGACAUAAUCU (SEQ ID Nº: 338)
Mouse_1_gRNA_13	UUAGUUGUGGAAUUAUCUUC (SEQ ID Nº: 339)
Mouse_1_gRNA_14	UGGUGGAGUCCCUGGAUGAU (SEQ ID Nº: 340)
Mouse_1_gRNA_15	GUGGAGAUAAUCUGUCCUAA (SEQ ID Nº: 341)
Mouse_1_gRNA_16	AGUCCCUAUCCCAUCAUCCA (SEQ ID Nº: 342)
Mouse_1_gRNA_17	AUCUUGGAUUUUGUCCCUG (SEQ ID Nº: 343)
Mouse_1_gRNA_18	GGGAUAGUUGGGCUGUAGU (SEQ ID Nº: 344)
Mouse_1_gRNA_19	CAGGUAGAAUGGCCUCUCC (SEQ ID Nº: 345)
Mouse_1_gRNA_20	UCUCUCAGCCGGCUCCCUCA (SEQ ID Nº: 346)

FIG. 14A

Região intrônica murídea 2 a mirar para a introdução do constructo genético:

```
TTATTCAGTTAACATGCTGGTGGTTGAGAGGGACACTCAGTCAGTCAGT
GACGTGAAGGGCTCTAACGCCAGTCCACATGCTCTGTGAACTCCCTCTGGCC
CTGCTTATTGTTGAATGGGCCAAAGGTCTGAGACCAGGCTGCTGGTAGG
CCTGGACTTGGGTCTCCCACCCAGACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTTCTGC
CACCCATCCACCTGGCTGCTCATGGACCAGCCAGCCTCGGTGGCTTGAAGGA
ACAATTCCACACAAAGACTCTGGACCTCTCCGAAACCAGGCACCGCAAATGGTA
AGCCAGAGGCAGCCACAGCTGTGGCTGCTCTTAAAGCTGTAAACTGTTTC
TGCTTAAGAGGGACTGAGTCTTCAGTCATTGCTTAGGGGGAGAAAGAGACATT
TGTGTGTCTTGAGTACCGTTGTGGTCACTCACATTAACTTCCCTGAAA
AACTAGTAAAAGAAAAATGTTGCCCTGTTAACCAATAATCATAGAGCTCATGGTAC
TTTGAGGAAATCTTAGAAAGCGTGTATAACAATTGTCGGAATTATTCAGTTAAGT
GTATTAGTTGAGGTACTGATGCTGCTCTACTTCAGTTACATGTGGGTTGAA
TTTGAAATCTATTCTGGCTCTCTTAAGCAGAAAATTAGATAAAATGGATACCTC
AGTGGTTTAATGGTGGGTTAATATAGAAGGAATTAAATTGGAAGCTAATTAA
GAATCAGTAAGGAGGGACCCAGGCTAACAGAAGGCAATCCTGGGATTCTGGAAAGA
AAAGATGTTTAGTTTATAGAAAACACTACTACATTCTTGATCTACAACCTCAA
TGTGGTTAATGAATTGAAGTTGCCAGTAAATGTACTTCCTGGTTGTTAAAGAA
TGGTATCAAAGGACAGTGCTTAGATCCGAGGTGAGTGTGAGAGGACAGGGCT
GGGGTATGGATACGCAGAAGGAAGGCCACAGCTGTACAGAATTGAGAAAGAAT
AGAGACCTGCAGTTGAGGCCAGCAGGTGGCTGGACTAACTCTCCAGGCCACAG
TAATGACCCAGACAGAGAAAGCCAGACTCATAAAGCTTGCTGAGCAGGAAATTAAAG
GGAACAAAGGTTGAGAGGCCCTAGTAAGCGAGGCTCTAAAAGCACAGCTGAGCT
GAGATGGGTGGGCTCTCTGAGTGCTCTAAATGCGCTAAACTGAGGTGATTA
CTCTGAGGTAAGCAAAGCTGGGCTTGAGCCAAAATGAAGTAGACTGTAATGAAC
TGGAAATGAGCTGGGCCGCTAACGCTAAACTAGGCTGGCTTAACCGAGATGAGCC
AAACTGGAATGAACTTCATTAATCTAGGTTGAATAGAGCTAAACTCTACTGCCCTA
CACTGGACTGTTCTGAGCTGAGATGAGCTGGGGTGAGCTCAGCTATGCTACGC
TGTGTTGGGGTGAGCTGATCTGAAATGAGATACTCTGGAGTAGCTGAGATGGG
GTGAGATGGGTG (SEQ ID N°: 4)
```

FIG. 14B

MOUSE_REGION_2_gRNA_1	CCGAAACCAGGCACCGCAA <u>ATGG</u> (SEQ ID Nº: 65)
MOUSE_REGION_2_gRNA_2	CACCGCAA <u>ATGGTAA</u> GCCAG <u>AGGG</u> (SEQ ID Nº: 66)
MOUSE_REGION_2_gRNA_3	GGCTTACCA <u>TTGCGGTGCCTGG</u> (SEQ ID Nº: 67)
MOUSE_REGION_2_gRNA_4	TGCGGTGCCTGG <u>TTCGGAGAGGG</u> (SEQ ID Nº: 68)
MOUSE_REGION_2_gRNA_5	CAGCTATGCTACGCTGT <u>GTTGGG</u> (SEQ ID Nº: 69)
MOUSE_REGION_2_gRNA_6	AAGGACAGTGCTTAG <u>ATCCGAGGG</u> (SEQ ID Nº: 70)
MOUSE_REGION_2_gRNA_7	TCAGTCAGTCAGTGACGT <u>GAAGGG</u> (SEQ ID Nº: 71)
MOUSE_REGION_2_gRNA_8	CATGCTGG <u>TTGGTGGT</u> GAG <u>AGGG</u> (SEQ ID Nº: 72)
MOUSE_REGION_2_gRNA_9	TCTTTGAGTACCG <u>TTGTCTGGG</u> (SEQ ID Nº: 73)
MOUSE_REGION_2_gRNA_10	TGGCCCATTCAACA <u>ATAAGCAGGG</u> (SEQ ID Nº: 74)
MOUSE_REGION_2_gRNA_11	CTGGGCCG <u>CTAACGCTAA</u> ACTAGG (SEQ ID Nº: 75)
MOUSE_REGION_2_gRNA_12	GCCAGCCTAG <u>TTAGCTTAGCGG</u> (SEQ ID Nº: 76)
MOUSE_REGION_2_gRNA_13	TGAAGTAGACTG <u>TAATGAAC</u> TGG (SEQ ID Nº: 77)
MOUSE_REGION_2_gRNA_14	GACCTGG <u>GAATGTATGGT</u> TGG (SEQ ID Nº: 78)
MOUSE_REGION_2_gRNA_15	GGTATGG <u>ATACGCAGAAGGA</u> AGGG (SEQ ID Nº: 79)
MOUSE_REGION_2_gRNA_16	GTTGAGAG <u>CCCTAGTAAGCG</u> AGGG (SEQ ID Nº: 80)
MOUSE_REGION_2_gRNA_17	GCCG <u>CTAACGCTAA</u> ACTAGG <u>CTGG</u> (SEQ ID Nº: 81)
MOUSE_REGION_2_gRNA_18	TCAGCTATGCTACGCTGT <u>GG</u> (SEQ ID Nº: 82)
MOUSE_REGION_2_gRNA_19	TTTAGAGCCTCG <u>CTTACTAGGG</u> (SEQ ID Nº: 83)
MOUSE_REGION_2_gRNA_20	CTCTATGATTATTGG <u>TTAAC</u> AGGG (SEQ ID Nº: 84)

FIG. 14B (continuação)

MOUSE_2_gRNA_1	CCGAAACCAGGCACCGCAAA (SEQ ID Nº: 347)
MOUSE_2_gRNA_2	CACCGCAAUUGGUAGGCCAG (SEQ ID Nº: 348)
MOUSE_2_gRNA_3	GGCUUACCAUUUGCGGUGGCC (SEQ ID Nº: 349)
MOUSE_2_gRNA_4	UGC GGUGCCUGGUUCGGAG (SEQ ID Nº: 350)
MOUSE_2_gRNA_5	CAGCUAUGCACGCUUGUU (SEQ ID Nº: 351)
MOUSE_2_gRNA_6	AAGGACAGUGCUUAGAUCCG (SEQ ID Nº: 352)
MOUSE_2_gRNA_7	UCAGUCAGUCAGUGACGUGA (SEQ ID Nº: 353)
MOUSE_2_gRNA_8	CAUGCUGGUUGGUUGGUUGAG (SEQ ID Nº: 354)
MOUSE_2_gRNA_9	UCUUUUGAGUACCGUUGUCU (SEQ ID Nº: 355)
MOUSE_2_gRNA_10	UGGCCCAUUCACAAUAAGC (SEQ ID Nº: 356)
MOUSE_2_gRNA_11	CUGGGCCGCUAACGUAAACU (SEQ ID Nº: 357)
MOUSE_2_gRNA_12	GCCAGCCUAGUUUAGCUUAG (SEQ ID Nº: 358)
MOUSE_2_gRNA_13	UGAAGUAGACUGUAAUGAAC (SEQ ID Nº: 359)
MOUSE_2_gRNA_14	GACCUGGGAAUGUAUGGUUG (SEQ ID Nº: 360)
MOUSE_2_gRNA_15	GGUAUGGAUACGCCAGAAGGA (SEQ ID Nº: 361)
MOUSE_2_gRNA_16	GUUGAGAGCCCAGUAAGCG (SEQ ID Nº: 362)
MOUSE_2_gRNA_17	GCCGCUAACGUAAACUAGGC (SEQ ID Nº: 363)
MOUSE_2_gRNA_18	UCAGCUAUGCACGCUUGU (SEQ ID Nº: 364)
MOUSE_2_gRNA_19	UUUUAAGAGCCUCGCUUACUA (SEQ ID Nº: 365)
MOUSE_2_gRNA_20	CUCUAUGAUUAUUGGUUAAC (SEQ ID Nº: 366)

FIG. 15A

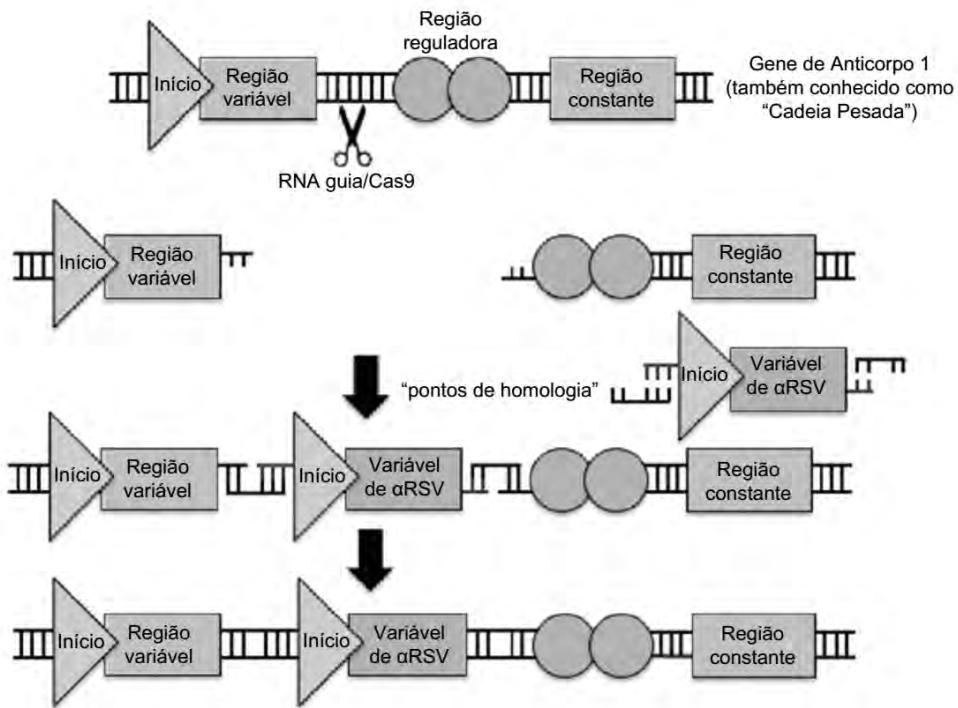


FIG. 15B

Modelos de Reparo

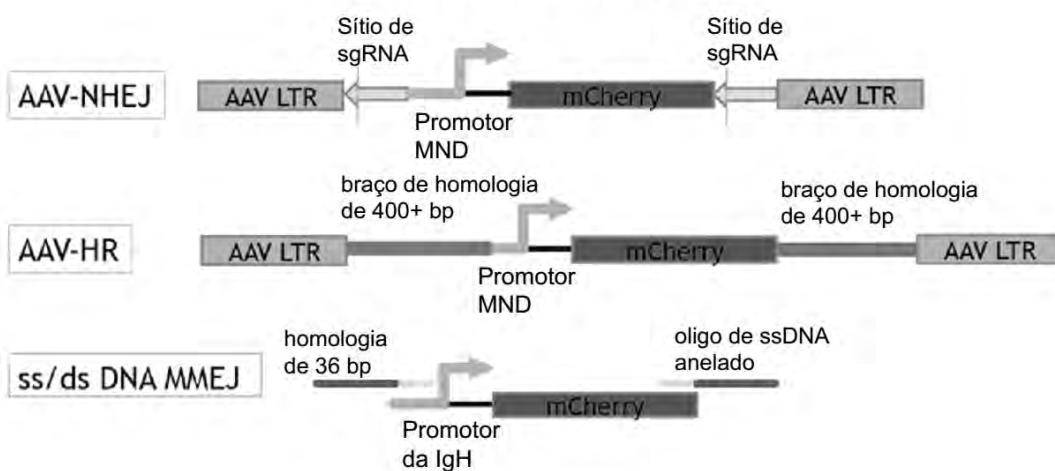


FIG. 16

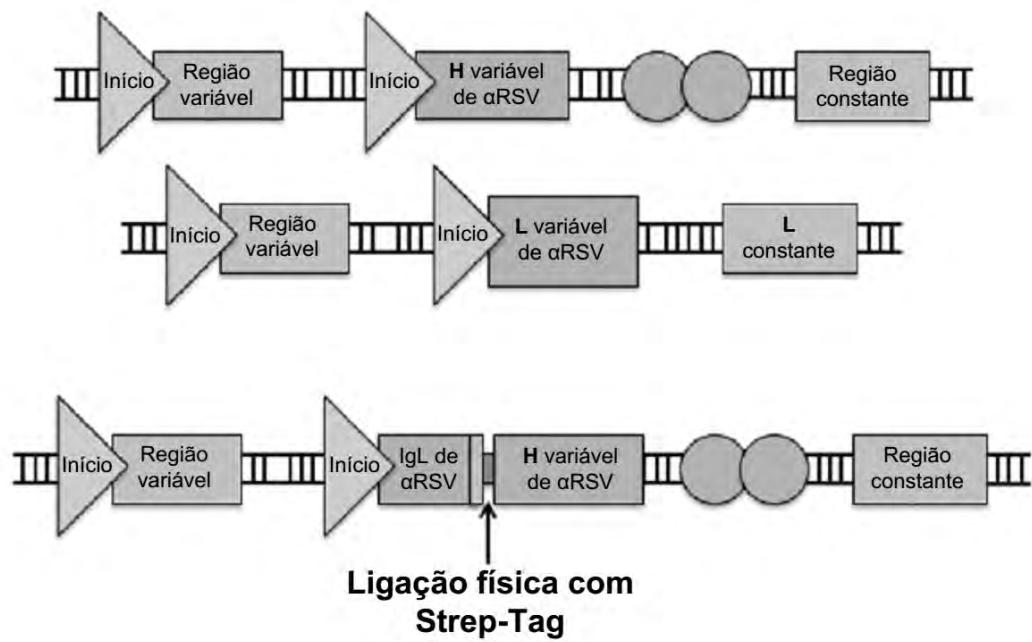


FIG. 17

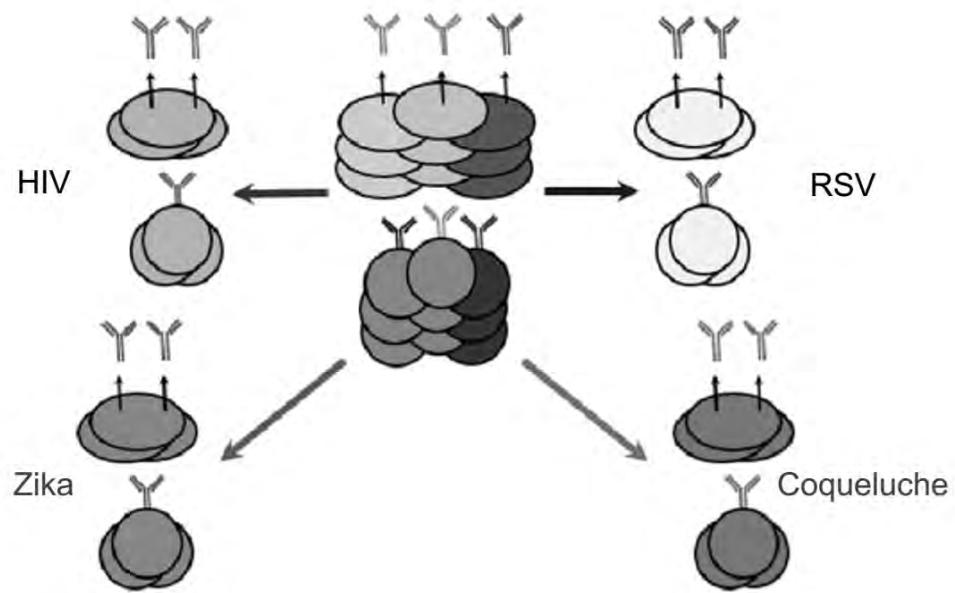


FIG. 18A

FIG. 18B

FIG. 18C

Células eletroporadas com o complexo Cas9-sgRNA

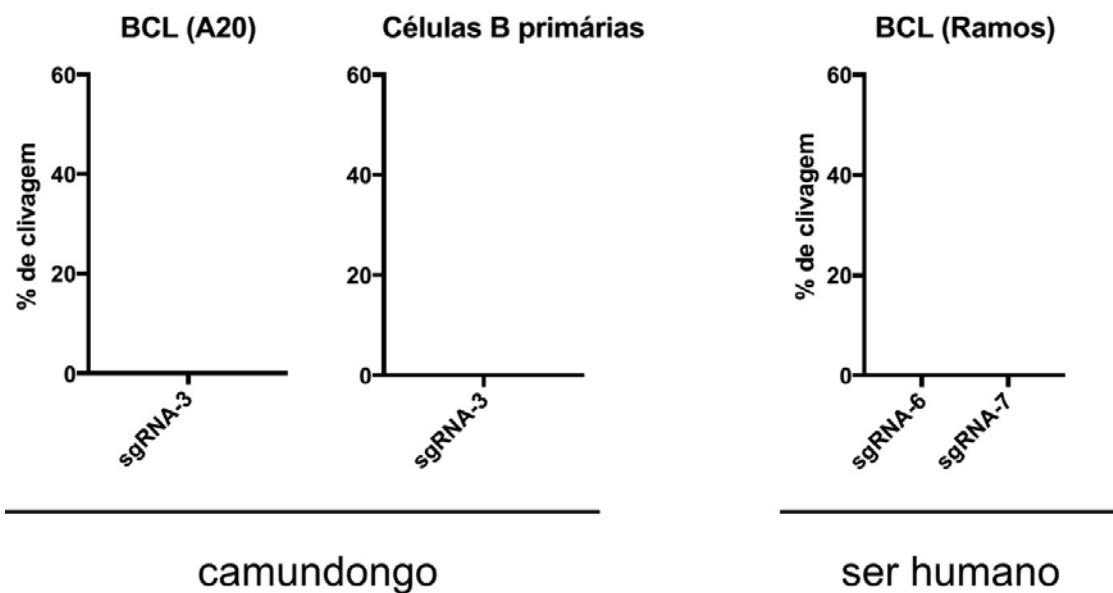


FIG. 19

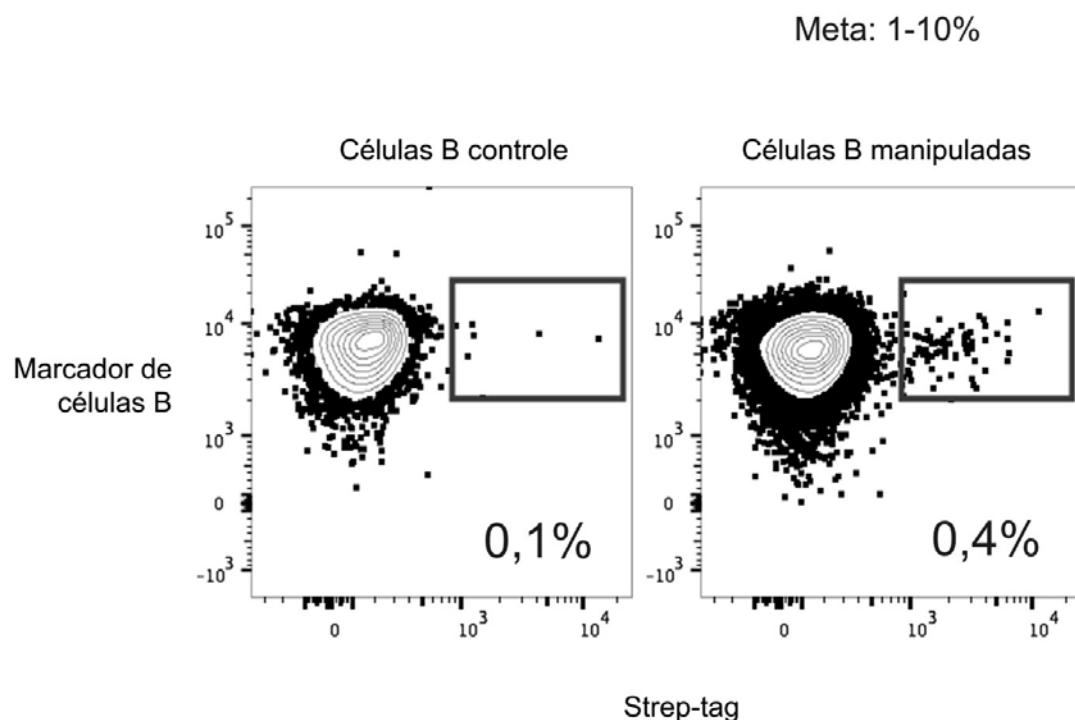


FIG. 20

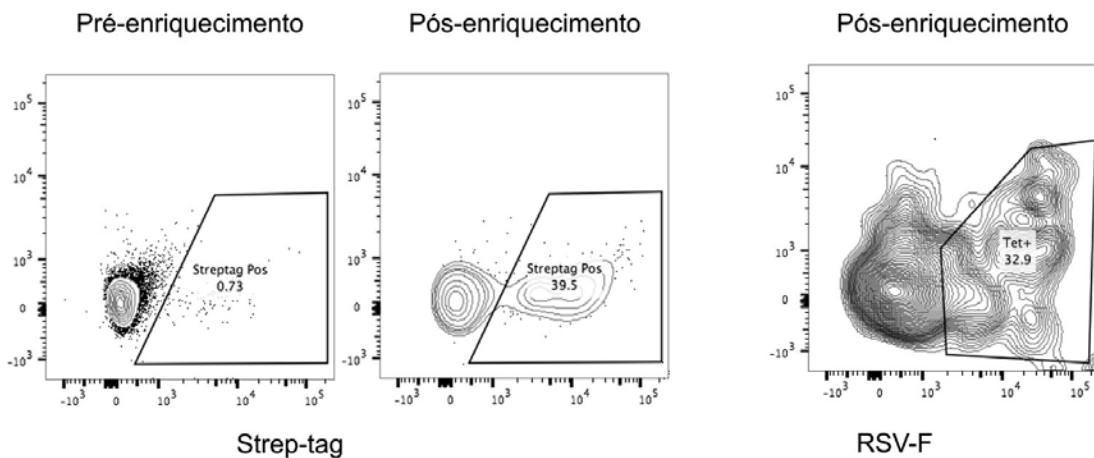


FIG. 21

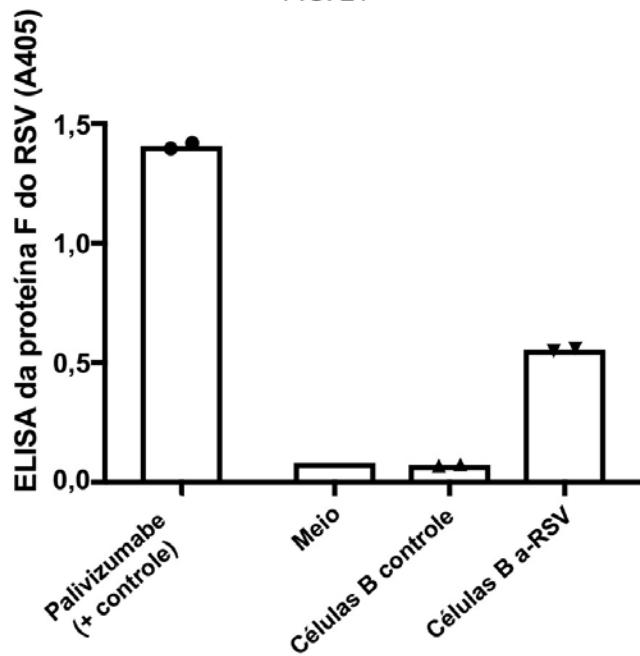


FIG. 22A

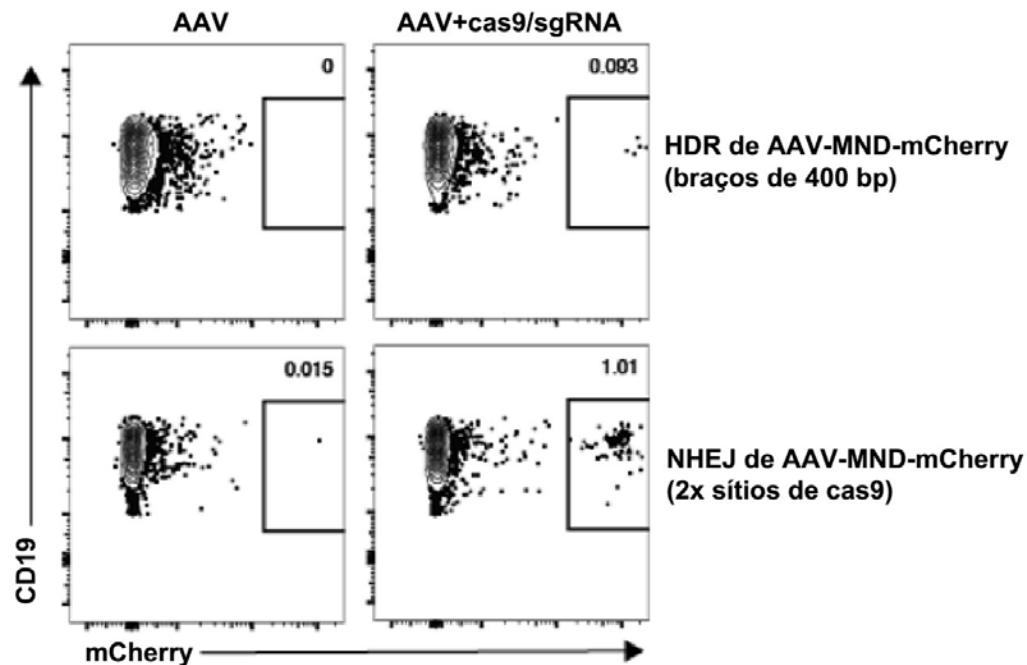


FIG. 22B

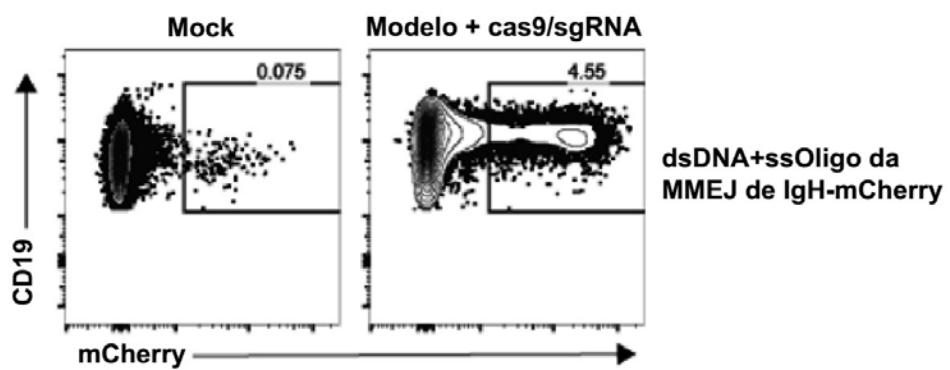


FIG. 23A

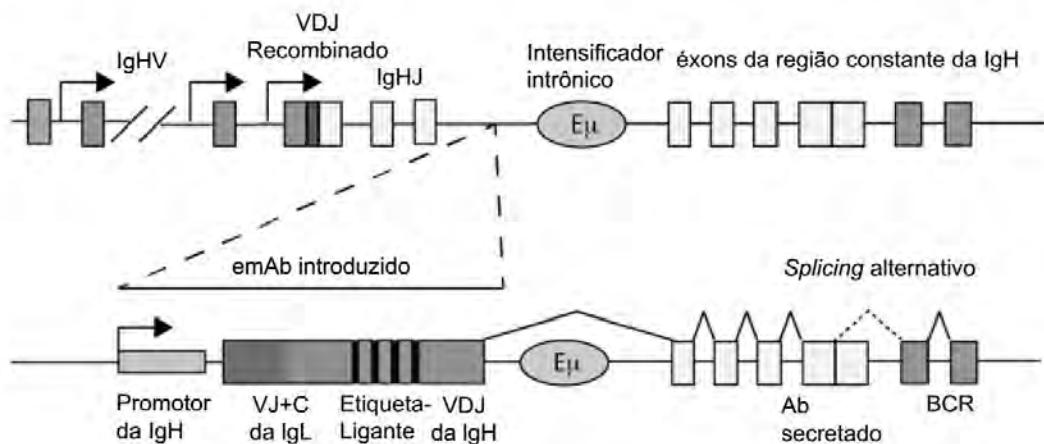


FIG. 23B

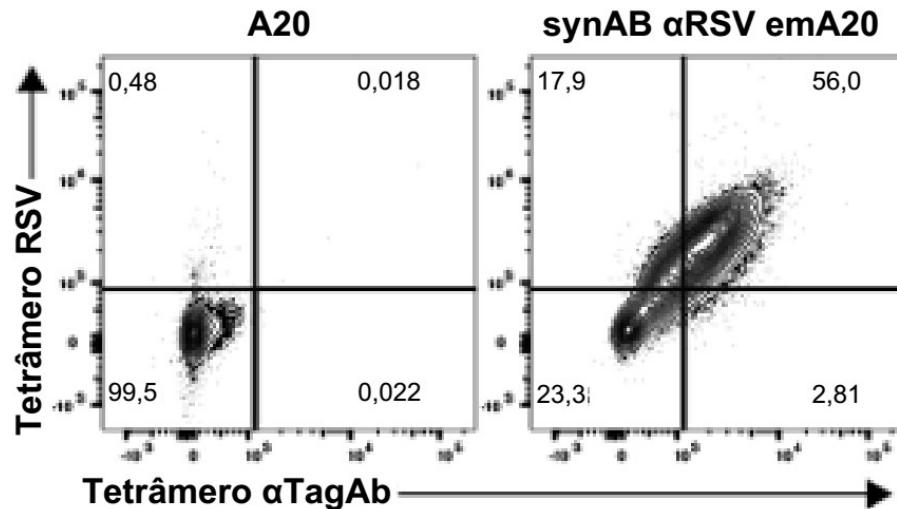


FIG. 23C

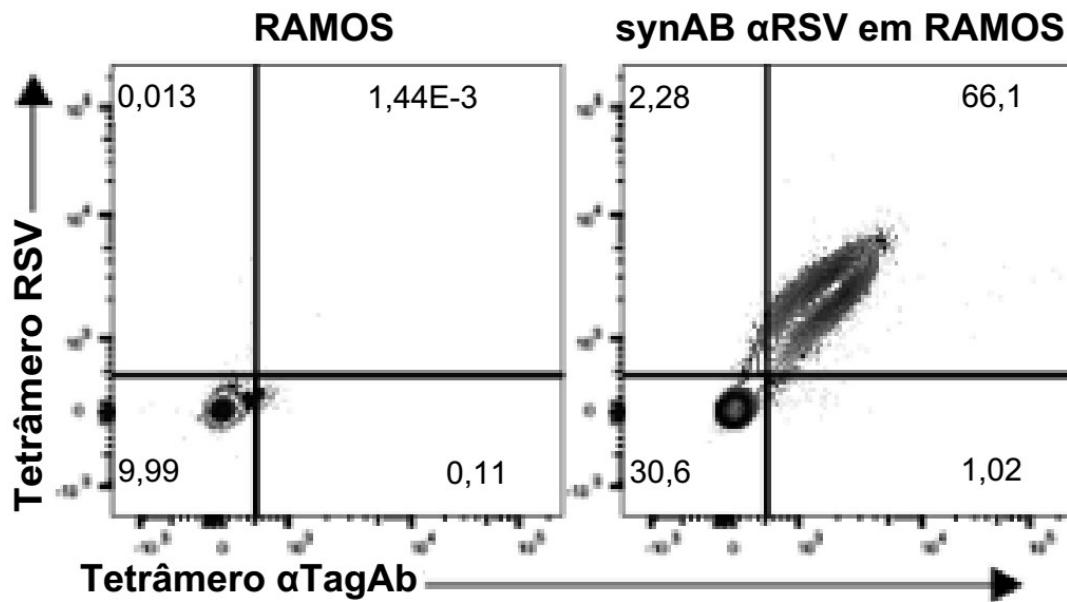


FIG. 23D

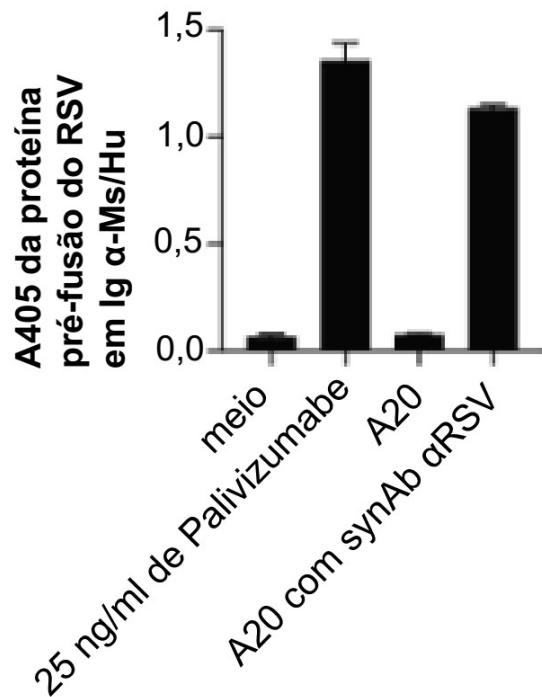


FIG. 23E

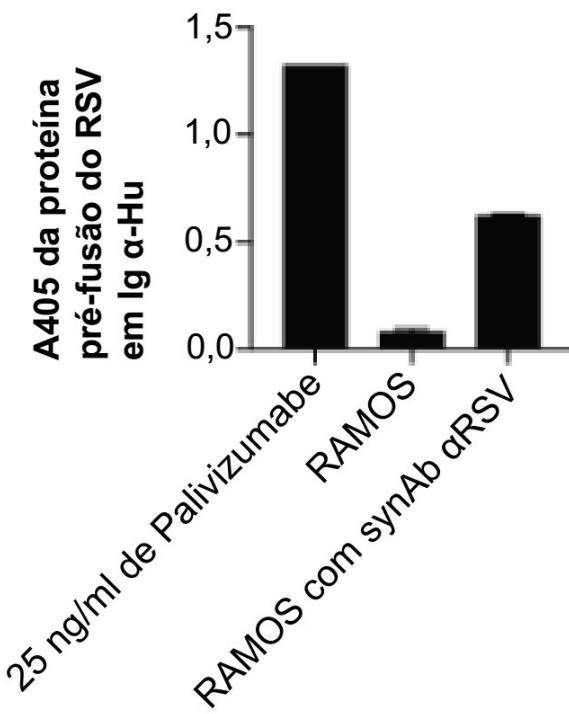


FIG. 24A

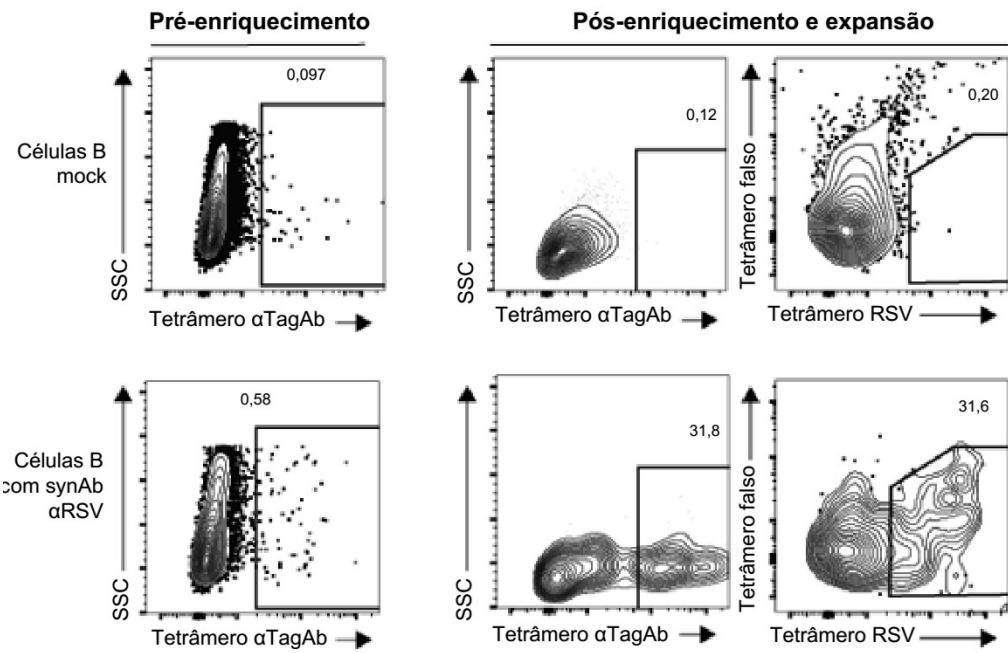


FIG. 24B

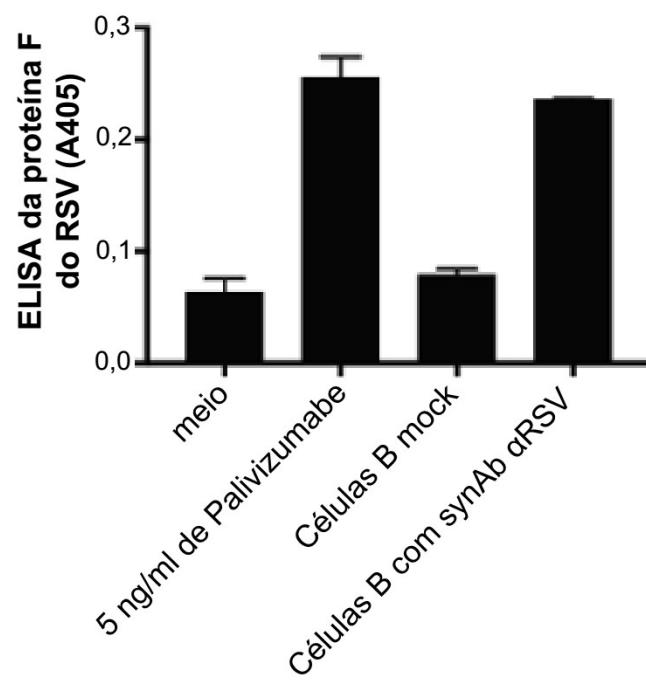


FIG. 24C

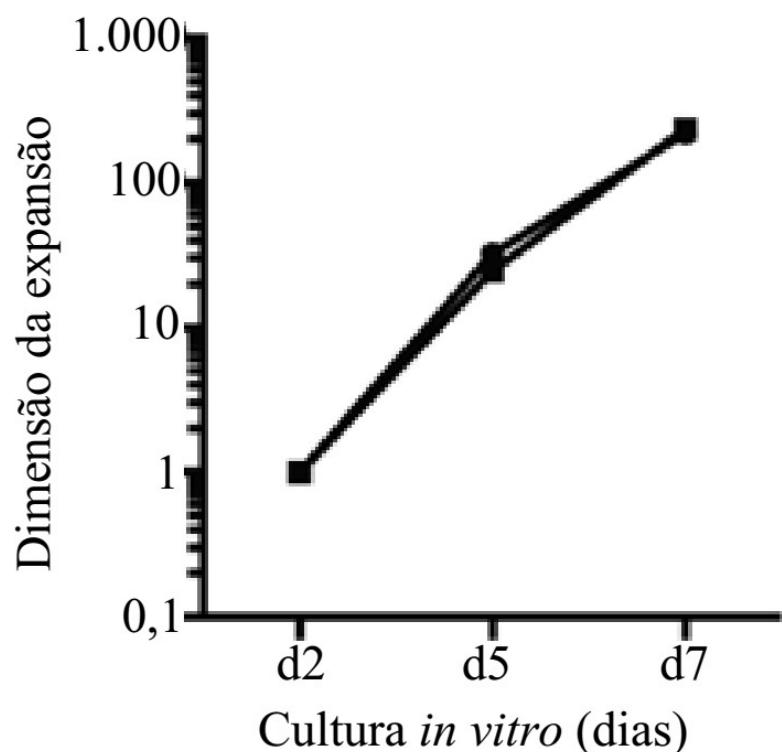


FIG. 25A

Sequênicas de sgRNA:

Murídea: sgRNA-mlgH_3: UUAUACAGUAUCCGAUGCAU (SEQ ID Nº: 87)

Humanas: sgRNA-hlgH-6: GCAUUGCAGGUUGGUCCUCG (SEQ ID Nº: 88)

sgRNA-hlgH-7: GUCUCAGGAGCGGUGUCUGU (SEQ ID Nº: 89)

Regiões de Homologia de Genoma Murídeas (para sgRNA-mlgH_3):

A montante: CATCGGATACTGTATAATGCTGTCACAGAGGTGGT (SEQ ID Nº: 90)

A jusante: CATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGACTTTCTTTA (SEQ ID Nº: 91)

Regiões de Homologia de Genoma Humanas (para sgRNA-hlgH-7):

GACACCGCTCCTGAGACACATTCCCTCAGCCATCACT (SEQ ID Nº: 92)

TGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAACATCG (SEQ ID Nº: 93)

Regiões de Homologia de Genoma Humanas (para sgRNA-hlgH-6):

GGGACCAACCTGCAATGCTCAGGAAACCCCACAGGC (SEQ ID Nº: 94)

TTCGGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGCGGACTGGC (SEQ ID Nº: 95)

Oligonucleotídeos de *splicing* (homologia com o genoma indicado em negrito):

Murídeos (para sgRNA-mlgH_3):

A montante: CTTCGAGACAT**GT**TACAGACCATTAGATGTAGTATCAAAGCCTAATATCTCA
ATCTTAAAATAGAATCCTAAC**CTGAGACACTCACTTGTCATCGGATACTGTATAATGC**

TGTACAGAGGTGGT (SEQ ID Nº: 96)

A jusante: CTTCTCCCATTCTAAATGCATGTTGGGGGGATTCTGGGCCTTCAGGACCACA
TAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGACTTTCTTTA (SEQ ID Nº: 97)

Humanos (para sgRNA-hlgH-7):

A montante: GTGCACAGCGCTTCCCGCTGCAGAACAAACCCAAACCCAGGATGCAC
TCCTCACTGTGAACCCACATTATTGGCCTAAAGATTACGG**GACACCGCTCCTGAGACA**
CATTCCCTAGCCATCACT (SEQ ID Nº: 98)

A jusante: GTCTGGGGATAGCGGGGAGCCAGGTGTACTGGGCCAGGCAAGGGCTTGTT
GTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAACATCG (SEQ ID Nº: 99)

Humanos (para sgRNA-hlgH-6):

A montante: GTGCACAGCGCTTCCCGCTGCAGAACAAACCCAAACCCAGGATGCAC
TCCTCACTGTGAACCCACATTATTGGCCTAAAGATTACGG**GGGACCAACCTGCAATGCTCAGGAAACCCCACAGGC**
AATGCTCAGGAACCCCACAGGC (SEQ ID Nº: 100)

A jusante: GTCTGGGGATAGCGGGGAGCCAGGTGTACTGGGCCAGGCAAGGGCT
TTGGTTGGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGCGGACTGGC (SEQ ID Nº: 101)

33/110

FIG. 25B
AAV com emAb anti-RSV humano (2.531 bp)

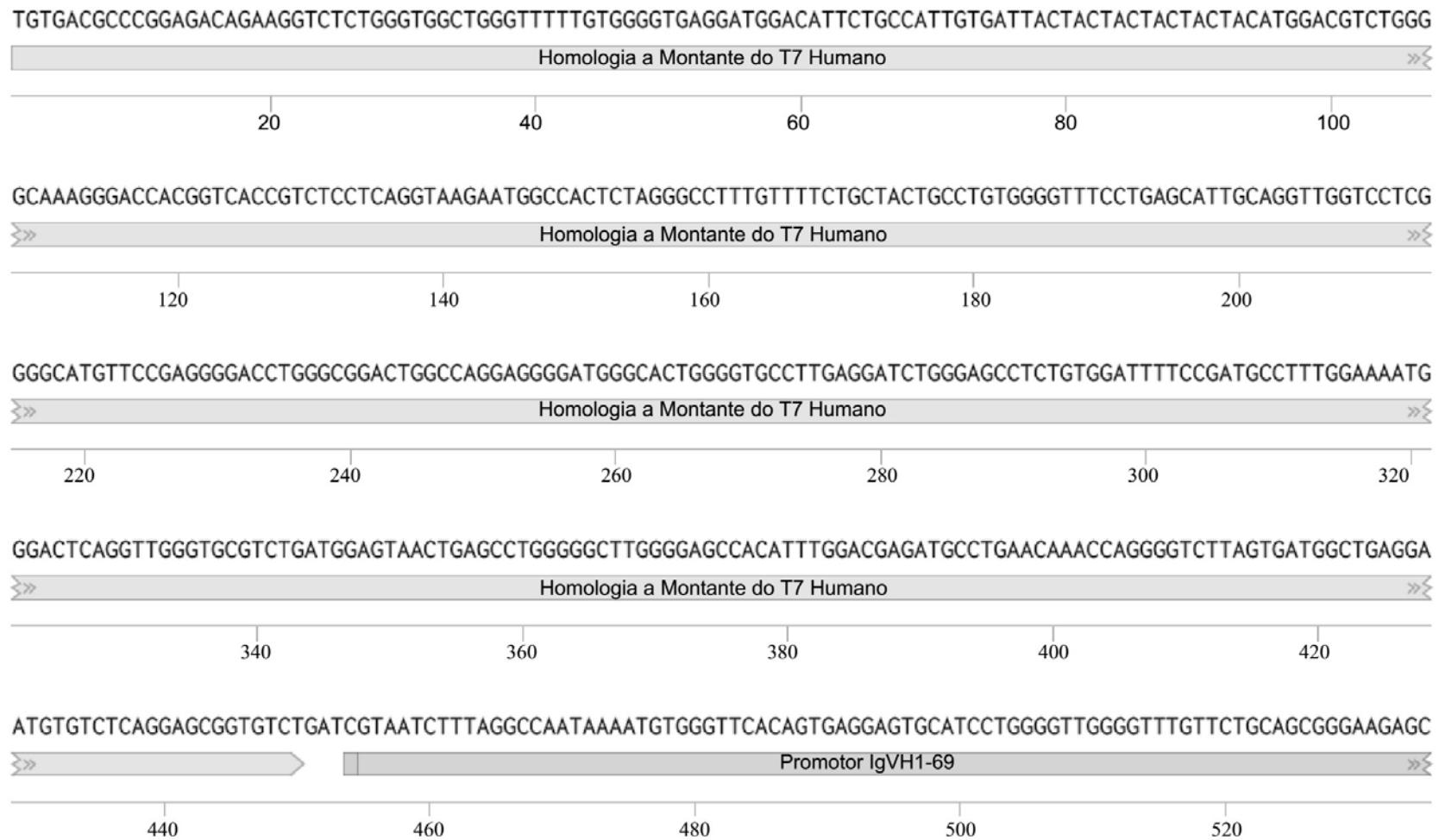


FIG. 25B (continuação)

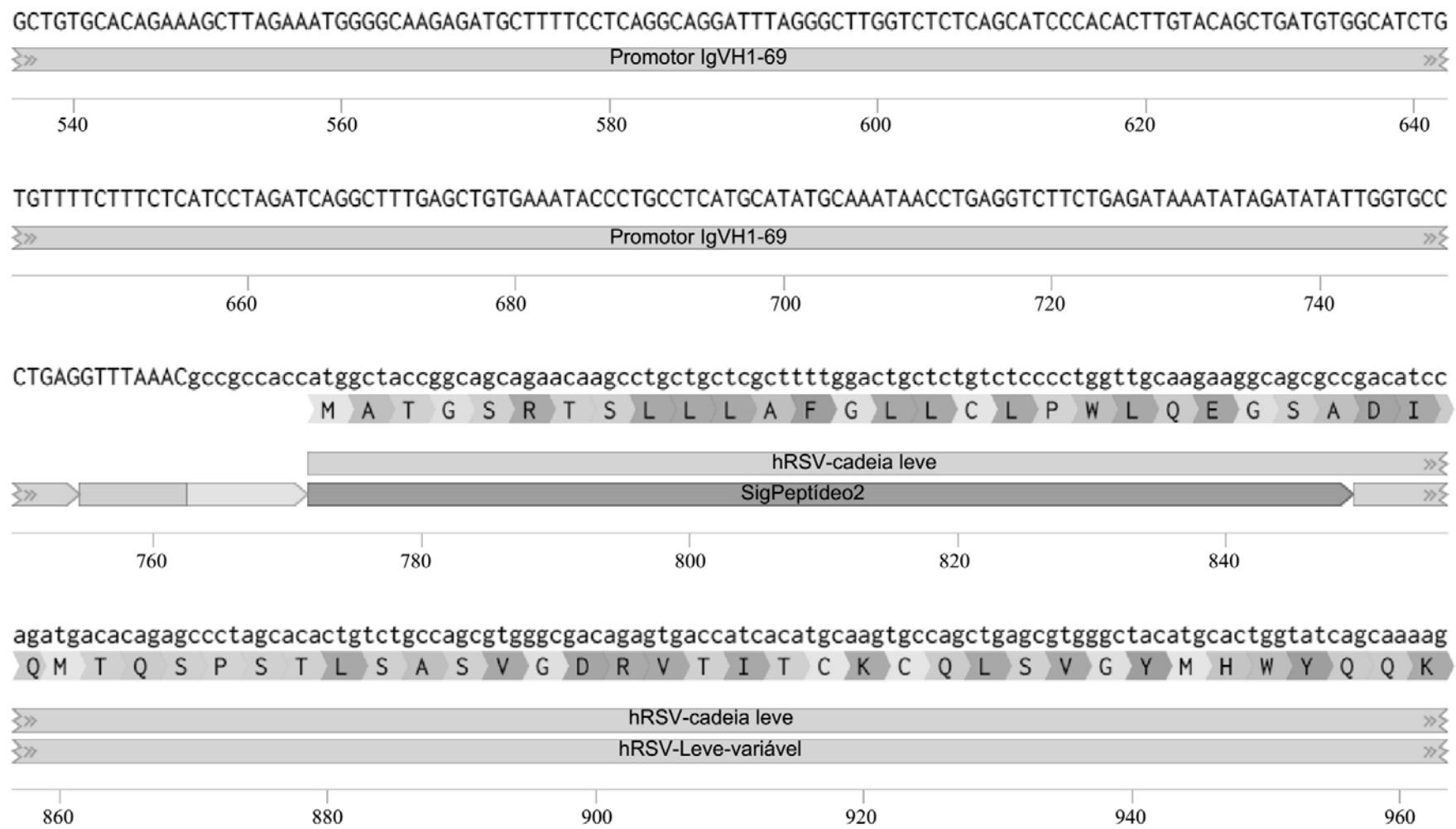


FIG. 25B (continuação)

ccggcaaggcccctaagctgatctacgataccccaagctggccttgcgtccctccagatttctggcagcggcagcggaccgagttcaccctgaccat
 P G K A P K L L I Y D T S K L A S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I

» hRSV-cadeia leve
 » hRSV-Leve-variável

980 1.000 1.020 1.040 1.060

ctcaaggcctgcagcctgacgacttcgctacgtactactgcttccaaggcagcggctacccttacattggcggcggaaacaaagctggaaatcaagcggactgtgg
 S S L Q P D D F A T Y Y C F Q G S G Y P F T F G G G T K L E I K R T V

» hRSV-cadeia leve
 » hRSV-Leve-variável

1.080 1.100 1.120 1.140 1.160

ccgctcctagcgtttcatcttccacccatcgacgagcagctgaagtctggactgcctctgtcggtgcctgctgaacaacttctaccctcgagaggccaaggtg
 A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V

» hRSV-cadeia leve
 » hRSV-LeveConstante

1.180 1.200 1.220 1.240 1.260 1.280

FIG. 25B (continuação)

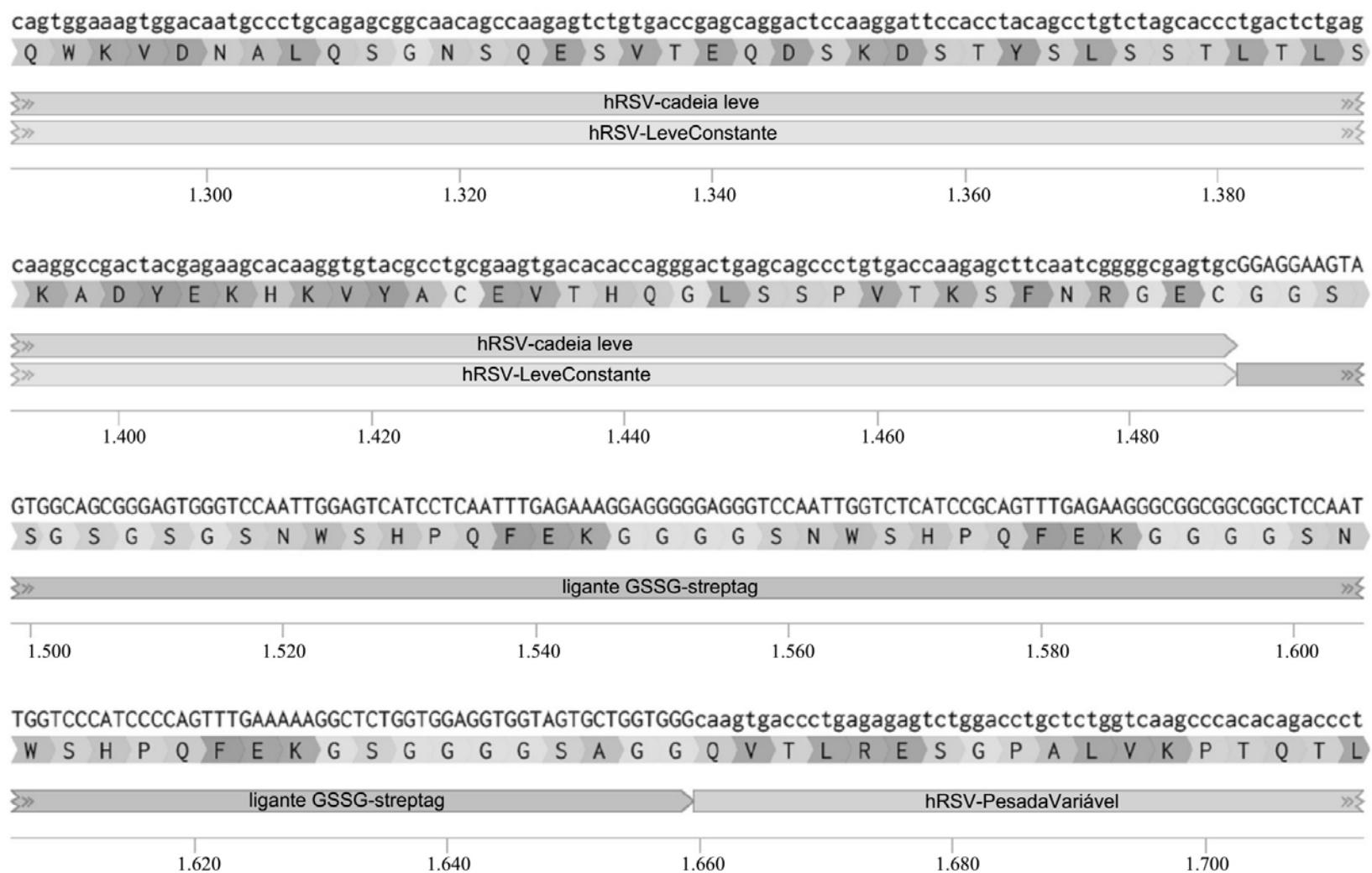


FIG. 25B (continuação)

gacactgacctgcacccaggcttagcctgagcacaaggcgcatgagcgtcggtggattagacagccctggcaagccctggaatggctggccgacattt
 T L T C T F S G F S L S T S G M S V G W I R Q P P G K A L E W L A D I

» hRSV-PesadaVariável »
 1.720 1.740 1.760 1.780 1.800

ggggacgacaagaaggactacaaccccagcctgaagtccggctgaccatcagcaaggacaccagcaagaaccagggtggtgctgaaagtgaccaacatggaccct
 W W D D K K D Y N P S L K S R L T I S K D T S K N Q V V L K V T N M D P

» hRSV-PesadaVariável »
 1.820 1.840 1.860 1.880 1.900 1.920

gccgacaccgcccacctaactgtgccagatccatgtaccaactggtaacttcgacgtgtggggagccggcaccacaACCGTCTTCAGGTAAGTCTGCTGTCTG
 A D T A T Y Y C A R S M I T N W Y F D V W G A G T T T V S S (SEQ ID Nº: 126)

» hRSV-PesadaVariável » Splice
 1.940 1.960 1.980 2.000 2.020

GGGATAGCGGGGAGCCAGGTGTACTGGGCCAGGCAAGGGCTTGGATCGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTAAATTTCTTACAATTATG
 Homologia a Jusante do T7 Humano »

2.040 2.060 2.080 2.100 2.120 2.140

FIG. 25B (continuação)

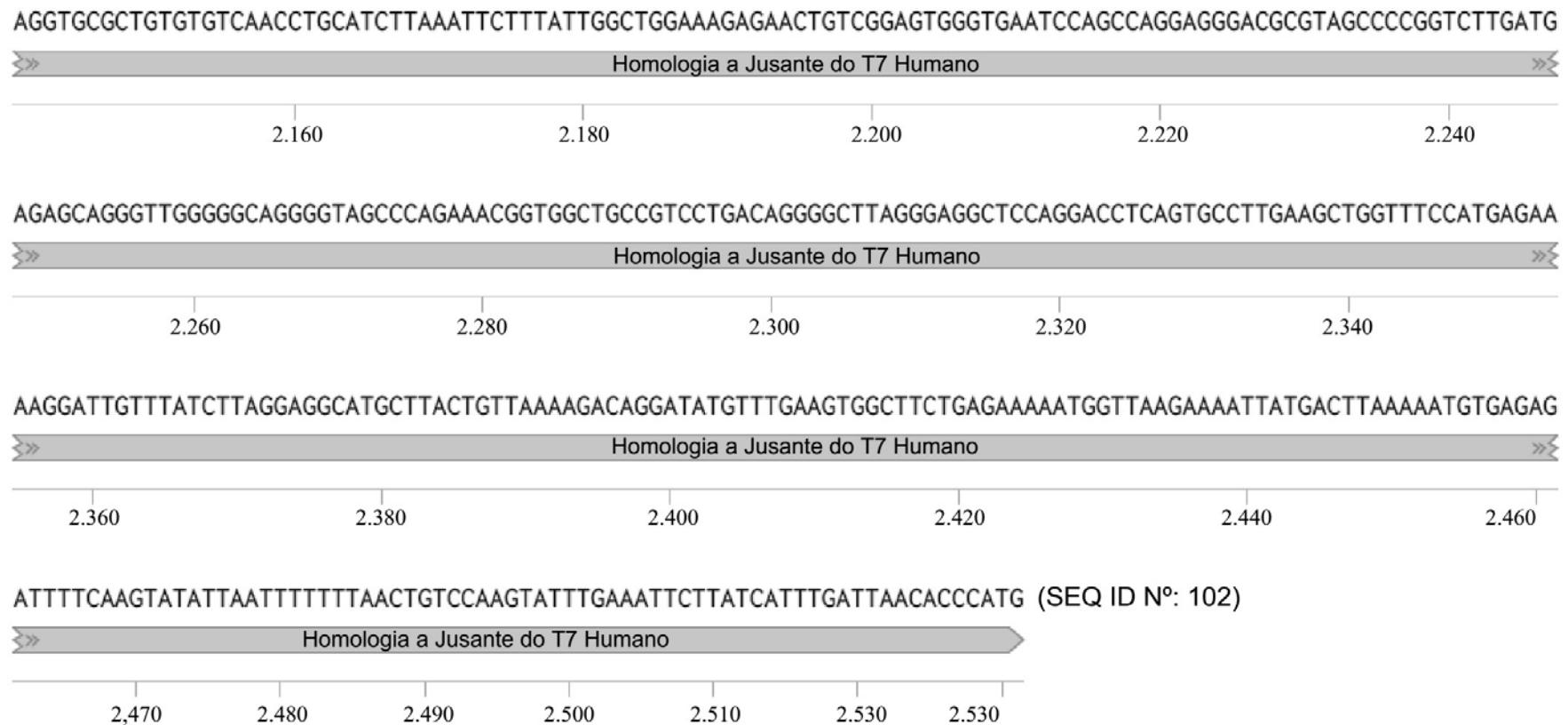


FIG. 25B (continuação)

>Região de homologia a montante do T17 humano no AAV com emAb anti-RSV humano
TGTGACGCCCGGAGACAGAAAGGTCTGGGTGGCTGGGTTTGAGGATGGACATTGCCATTGTGATTACTACTACTAC
TACATGGACGTCTGGGCATAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAAGAATGCCACTCTAGGGCCTTGTCTGACTGCCCTGT
GGGGTTTCCTGAGCATTGCAGGTTGGTCCTCGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGCGGACTGCCAGGAGGGATGGCACTGGGGTG
CCTTGAGGATCTGGGAGCCTCTGGATTTCCGATGCCCTGGAAAATGGGACTCAGGTTGGTGCCTGATGGAGTAAGTGAGCCTGG
GGGCTTGGGAGGCCACATTGGACGAGATGCCCTGAACAAACCAGGGTCTTAGTGATGGCTGAGGAATGTGTCAGGAGCGGTGTCT
(SEQ ID Nº: 110)

>Promotor IgVH1-69 no AAV com emAb anti-RSV humano
GTAATCTTAGGCCAATAAAATGTGGGTTCACAGTGAGGAGTGACATCCTGGGTTGGGTTGTTCTGCAGCGGGAAAGAGCGCTGTGCACA
GAAAGCTTAGAAATGGGGCAAGAGATGCTTCTCAGGCAGGATTAGGGCTTGGTCTCTCAGCATCCCACACTTGTACAGCTGATGTGGC
ATCTGTGTTCTTCATCCTAGATCAGGCTTGAGCTGTGAAATACCCCTGCCTCATGCATATGCAAATAACCTGAGGTCTTGAGATAAA
TATAGATATATTGGTGCCTGAG (SEQ ID Nº: 111)

>Sequência de codificação do peptídeo de sinal no AAV emAb anti-RSV humano
ATGGCTACCGGCAGCAGAACAAAGCCTGCTCGCTTGGACTGCTCTCCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCC (SEQ ID Nº: 112)

>Sequência de codificação da cadeia leve do hRSV no AAV com emAb anti-RSV humano
ATGGCTACCGGCAGCAGAACAAAGCCTGCTCGCTTGGACTGCTCTGTCTCCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCGACAT
CCAGATGACACAGAGCCCTAGCACACTGTCTGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGTGCCAGCTGAGCGTGGCTACAT
GCACTGGTATCAGCAAAAGCCCAGCAAGGCCCCCTAACGACTGCTGATCTACGATAACCTCCAAGCTGGCCTCTGGCGTGCCCTCCAGATTTCT
GGCAGCGGCAGCGGAACCGAGTTACCCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGCCTGACGACTTCGCTACGTACTACTGCTTCCAAGGCAGCGGC
TACCCCTTCACATTGGCGCGAACAAAGCTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCTAGCGTGTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGC
AGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGCGTGTGCTGAACAACCTCTACCCCTCGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCT
GCAGAGCGGCAGCAGCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACCTACAGCCTGTCTAGCACCCTGACTCTGAGCAAGGC
CGACTACGAGAACAGCACAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTCAATGGGGCGAGTG
C (SEQ ID Nº: 113)

FIG. 25B (continuação)

>Sequência de codificação da cadeia leve variável do hRSV no AAV com emAb anti-RSV humano
GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCACACTGTCTGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCACATGCAAGTGCCAGCTGAG
CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAAAGCCCCGCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGATACTCCAAGCTGGCCTCTG
GCGTGCCTCCAGATTCTGGCAGCAGCGGAACCGAGTTCACCTGACCATCTCAAGCCTGCAGCCTGACGACTTCGCT
ACGTACTACTGCTCCAAGGCAGCGGCTACCCCTCACATTGGCGCGAACAAAGCTGGAAATCAAGCGG (SEQ ID Nº: 114)

>Sequência de codificação da cadeia leve constante kappa no AAV com emAb anti-RSV humano
ACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGGCACTGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTG
AACAACTCTACCCCTCGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGAC
CGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACCTACAGCCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGGCCACTACGAGAAGCACAAGGTGT
ACGCCTGCGAAGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATGGGGCGAGTGC (SEQ ID Nº: 115)

>Sequência de codificação do ligante GSSG-streptag no AAV com emAb anti-RSV humano
GGAGGAAGTAGTGGCAGCGGGAGTGGGTCCAATTGGAGTCATCCTCAATTGAGAAAGGAGGGGAGGGTCCAATTGGTCTCA
TCCGCAGTTGAGAAGGGCGGCGGCGCTCCAATTGGTCCCATTCCCCAGTTGAAAAAGGCTTGTTGGAGGTGGTAGTGTG
GTGGG (SEQ ID Nº: 116)

>Sequência de codificação da cadeia pesada variável do hRSV no AAV com emAb anti-RSV humano
CAAGTGACCCCTGAGAGAGTCTGGACCTGCTCTGGTCAAGCCCACACAGACCCCTGACACTGACCTGCACCTTCAGCGGCTTAG
CCTGAGCACAAGCGGCATGAGCGTCGGCTGGATTAGACAGCCTCCTGGCAAAGCCCTGGAATGGCTGGCCGACATTGGTGG
GACGACAAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCGGCTGACCATCAGCAAGGACACCAGCAAGAACCAAGGTGGTGCTGAA
AGTGACCAACATGGACCCCTGCCGACACCGCCACCTACTGTGCCAGATCCATGATCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGG
AGCCGGCACCAACCGTCTTTCA (SEQ ID Nº: 117)

>Sequência de aminoácidos do peptídeo de sinal no AAV com emAb anti-RSV humano
MATGSRTSLLAFLCLPWLQEGSA (SEQ ID Nº: 118)

FIG. 25B (continuação)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve do hRSV no AAV com emAb anti-RSV humano
 MATGSRSTLLAFLCLPWLQEGSADIQMTCQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTE
 FTTLTISSLQPDDFATYYCFQGSQGYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID Nº: 119)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve variável do hRSV no AAV com emAb anti-RSV humano
 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQGSQGYPFT
 FGGGTKEIKR (SEQ ID Nº: 120)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve constante kappa no AAV com emAb anti-RSV humano
 TVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (SEQ ID Nº: 121)

>Sequência de aminoácidos do ligante GSSG-streptag no AAV com emAb anti-RSV humano
 GGSSGSGGSNWHPQFEKGGSNWHPQFEKGGSNWHPQFEKGSSGGAGG (SEQ ID Nº: 122)

>Sequência de aminoácidos da cadeia pesada variável do hRSV no AAV com emAb anti-RSV humano
 QVTLRESPGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATY
 YCARSMITNWYFDVWGAGTTVSS (SEQ ID Nº: 123)

>Junção de *splice* com sequência flanqueadora no AAV com emAb anti-RSV humano
 CAGGTAAGTCTGCTGGGATAGCGGGGAGCCAGGTGTACTGGGCCAGGCAAGGGCTTGGATC (SEQ ID Nº: 124)

>Homologia a jusante do T7 humano no AAV com emAb anti-RSV humano
 GTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAACATCGTAAATTCTTAGAATTATGAGGTGCGCTGTGTCAACCTGCATCTAAATTC
 TTTATTGGCTGGAAAGAGAACTGTCGGAGTGGGTGAATCCAGGCCAGGAGGGACCGTAGCCCCGGCTTGATGAGAGCAGGGTTGGGGGC
 AGGGGTAGCCCAGAAACGGTGGCTGCCGTCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAGGACCTCAGTGCCTGAAGCTGGTTCCATGAGAA
 AAGGATTGTTATCTTAGGAGGCATGCTTACTGTTAAAAGACAGGATATGTTGAAGTGGCTCTGAGAAAATGGTTAAGAAAATTATGACTT
 AAAAATGTGAGAGATTTCAAGTATATTAAATTCTTAAGTATTGAAATTCTTATCATTGATTAACACCCATG (SEQ ID Nº: 125)

FIG. 25B (continuação)

>Sequência de codificação da cadeia leve do hRSV sem sequência de sinal no AVV com emAb anti-RSV humano
GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCACACTGTCTGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGTGCCAGCTGAG
CGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAAAGCCCCGCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGATACTCCAAGCTGGCCTCTG
GCGTGCCTCCAGATTCTGGCAGCGGAGCGAGTTCACCTGACCATCTCAAGCCTGCAGCCTGACGACTTCGCT
ACGTACTACTGCTCCAAGGCAGCGGCTACCCCTCACATTGGCGGAAACAAAGCTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGC
TCCTAGCGTGTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGCCTCTGCGTGTGCCTGCTGAACAACCTCTA
CCCTCGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGAAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGAC
TCCAAGGATTCCACCTACAGCCTGTCTAGCACCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAACAGGTGTACGCCTGC
AGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATCGGGCGAGTGC (SEQ ID Nº: 280)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve do hRSV sem peptídeo de sinal no AVV com emAb anti-RSV humano
DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCF
QGSGYPFTFGGKTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID Nº: 285)

43/110

FIG. 25C
AAV com emAb anti-RSV murídeo (3.134 bp)

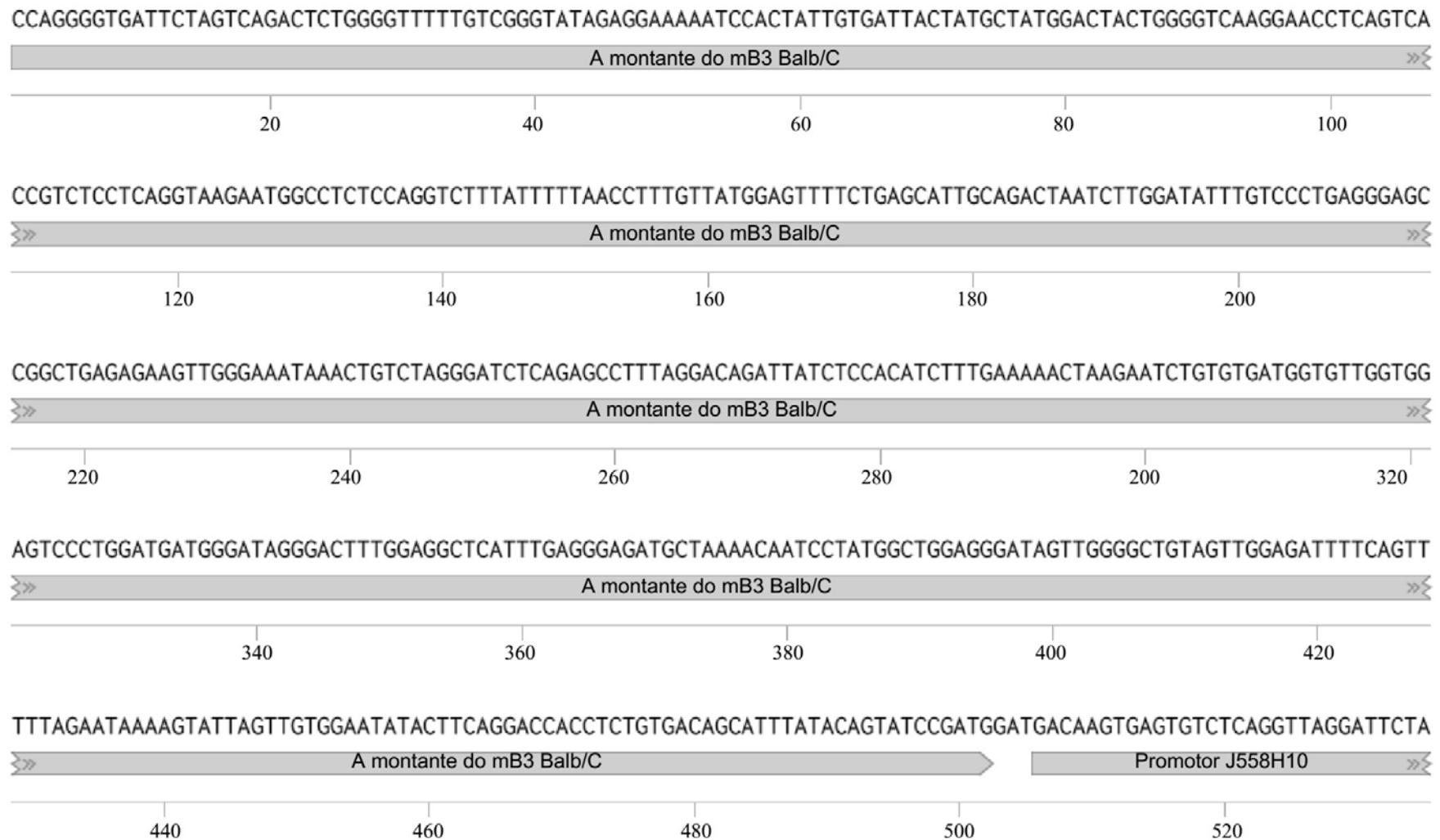


FIG. 25C (continuação)

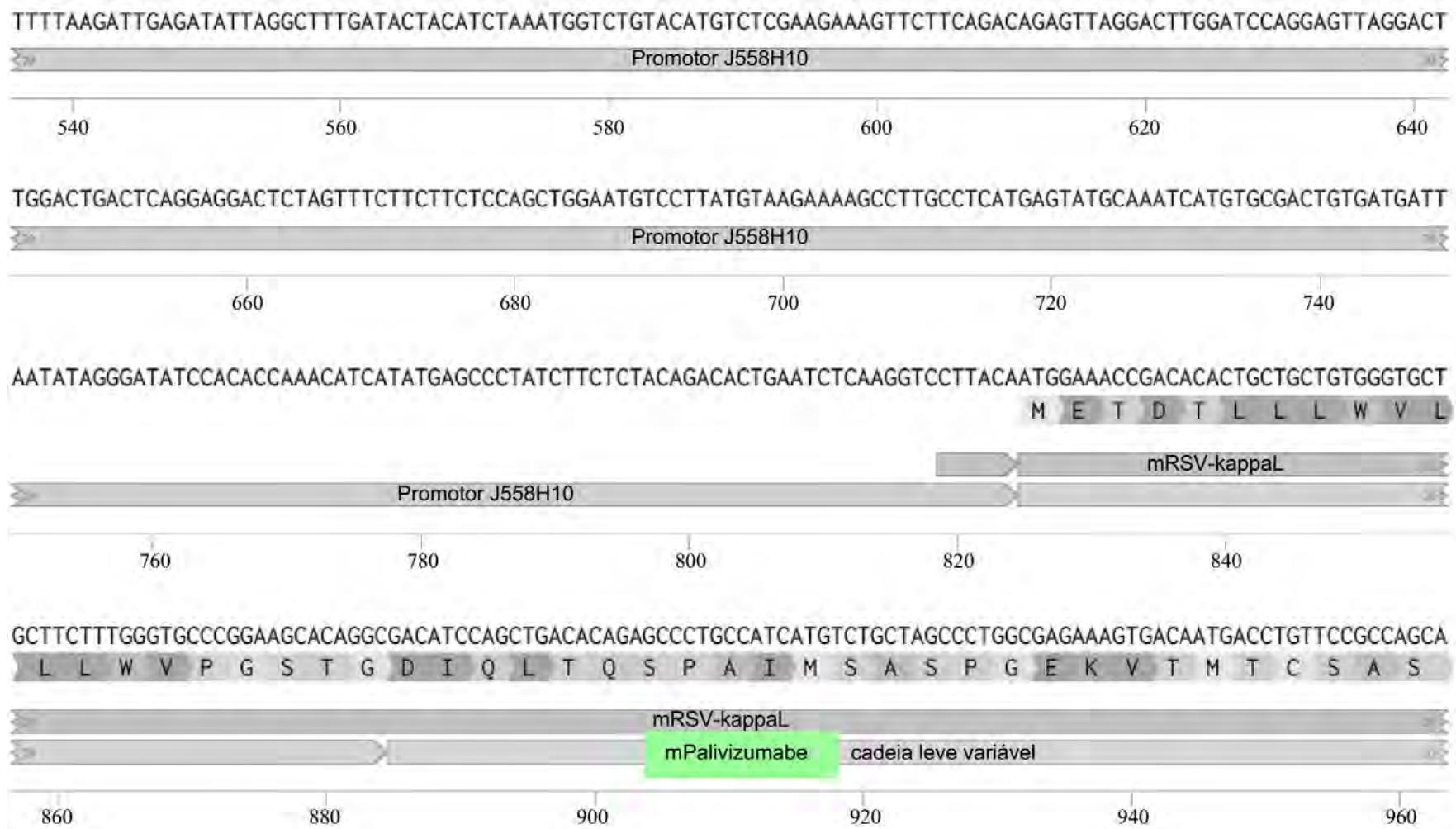


FIG. 25C (continuação)

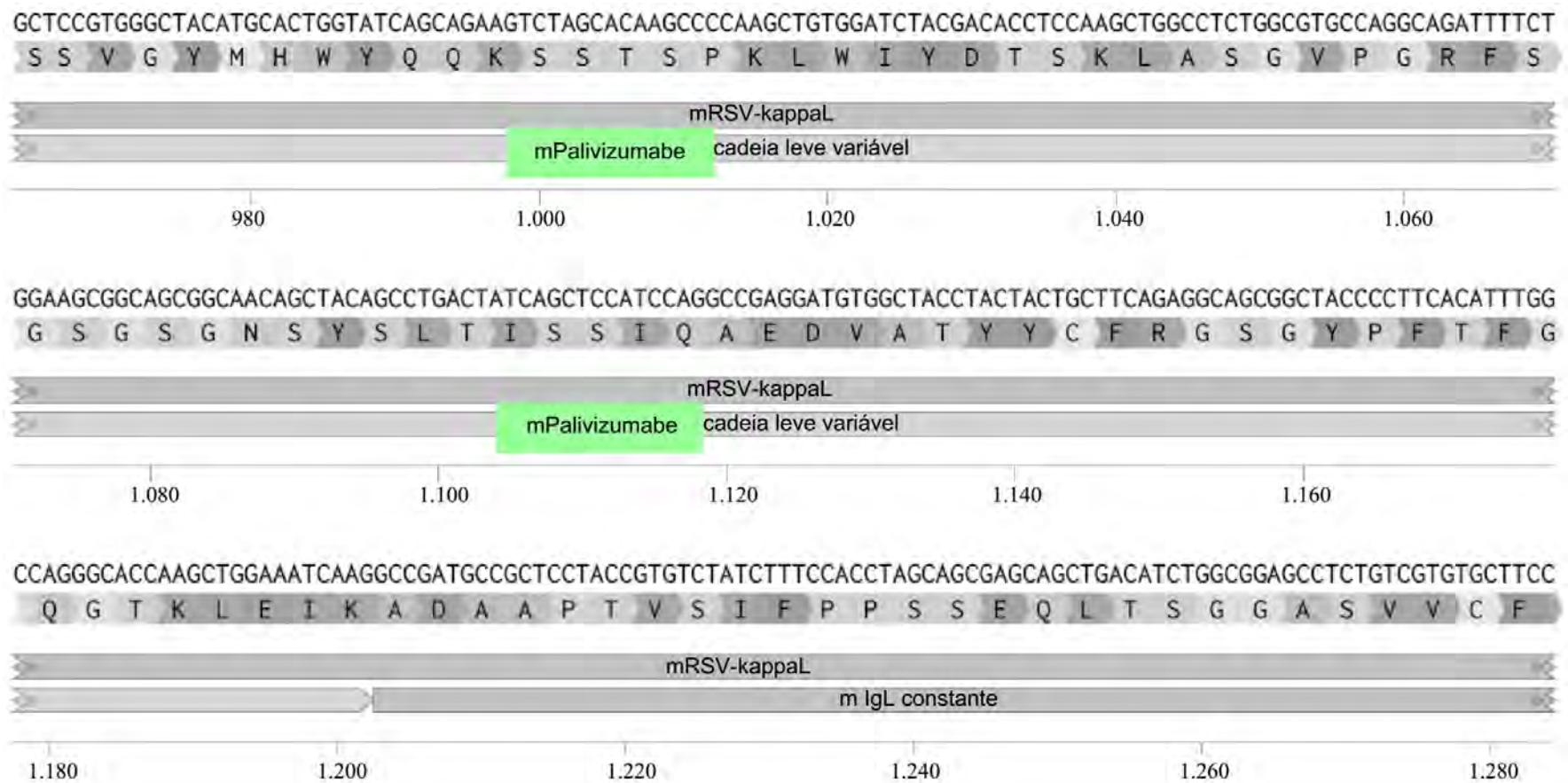


FIG. 25C (continuação)

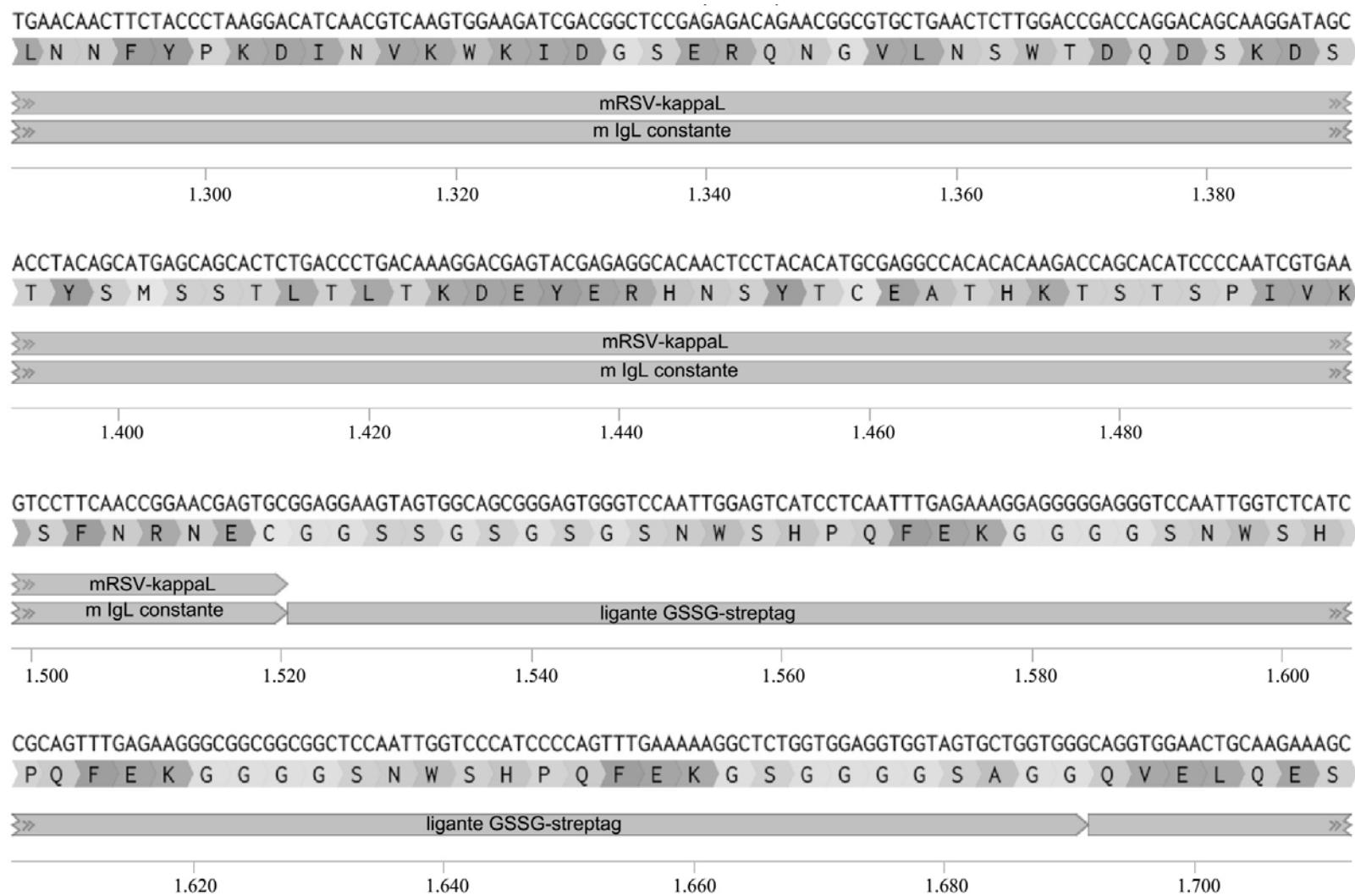


FIG. 25C (continuação)

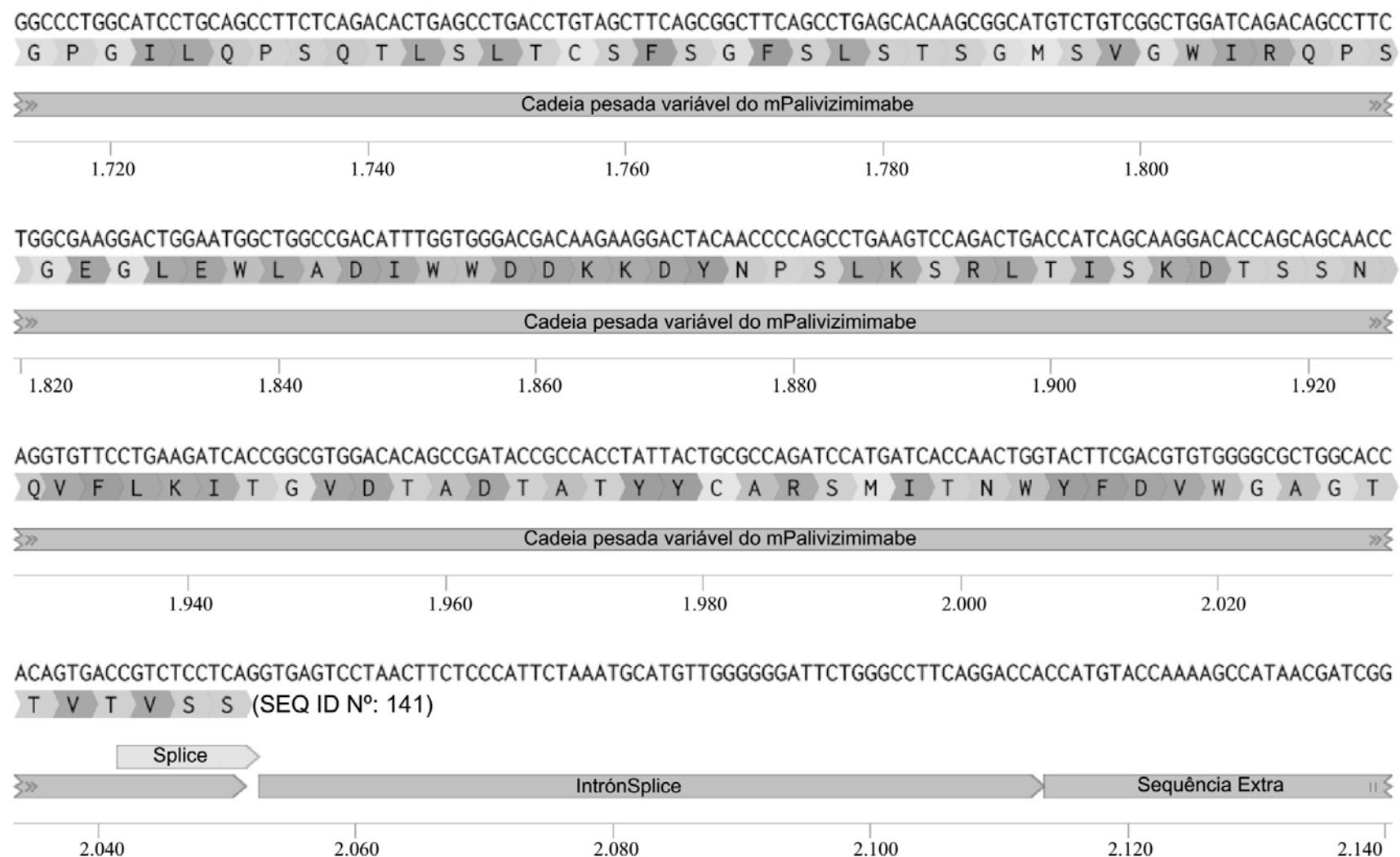


FIG. 25C (continuação)

TGGGAGTATTCTTGTGGTCAGAGATCCATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTAGATTGTGAGGAATGTTCCGCACTAGATTGTTAAAACCTTCATTT

A jusante do mB3 Balb/C

2,160 2,180 2,200 2,220 2,240

GTTGGAAGGAGAGCTGTCTTAGTGGATCAAGGGAGAAAGGCATCTAGCCTCGGCTCAAAAGGGTAGTTGCTGTCTAGAGAGGCTGGTGGAGGCTGCAAAAG

A jusante do mb3 Balb/C

2,260 2,280 2,300 2,320 2,340

TCCAGCTTCAAAGGAACACAGAAGTATGTATGGAATTAGAAAGATGTTGCTTACTCTTAAGTTGGTTCCTAGGAAAAAATAGTTAAACTGTGACTTTAAA

<>> A jusante do mB3 Balb/C >>

2 360 2 380 2 400 2 420 2 440 2 460

ATGTGAGAGGGTTTCAAGTACTCATTAAAAATGTCCAAAATTTGTCAATCAGTTGAGGTCTGTTGTAGAACTGATATTACTTAAAGTTAACCGAG

A iusante do mB3 Balb/C

2,480 2,500 2,520 2,540 2,560

GAATGGGAGTGAGGCTCTCTACATAACCTATTCACTGACTTTAACATAATAAAATTAAAGTTAAAATATTTTAAATGATTGAGCAATGTTGAGTTGGAGTC

A jusante do mB3 Balb/C

2,580 2,600 2,620 2,640 2,660

FIG. 25C (continuação)

AGATGGCCGATCAGAACCGAGAACACCTGCAGCAGCTGGCAGGAAGCAGGTATGTGGCAAGGCTATTGGGAAGGGAAAATAAAACACTAGGTAAACTGTAGCT
 ≫ A jusante do mB3 Balb/C ≫
 2.680 2.700 2.720 2.740 2.760 2.780

GTGGTTGAAGAAGTGGTTTGAAACACTCTGCCAGCCCCACCAAACCGAAAGTCCAGGCTGAGCAAAACACCACCTGGTAATTGCATTCTAAAATAAGTTGA
 ≫ A jusante do mB3 Balb/C ≫
 2.800 2.820 2.840 2.860 2.880

GGATTCAAGCCGAAACTGGAGAGGTCCCTTTAACTTATTGAGTTAACCTTTAATTAGCTTAGTTAGTTCTAGTTCCCCAACTTAAGTTATCGACTTCTA
 ≫ A jusante do mB3 Balb/C ≫
 2.900 2.920 2.940 2.960 2.980

AAATGTATTTAGAATTCAAAATTAGTTATGTAAGAAATTGAAGGACTTGTCTTAATTCTAATATATTAGAAAATTCTTAAATTACTCTATT
 ≫ A jusante do mB3 Balb/C ≫
 3.000 3.020 3.040 3.060 3.080 3.100

ATTCTTCCCTCTGATTATTGGTCTCCATTCA (SEQ ID N°: 103)
 ≫ A jusante do mB3 Balb/C ≫
 3.110 3.120 3.130

FIG. 25C (continuação)

>Região a montante do mB3 Balb/C murídeo no AAV com anti-RSV murídeo

```
CCAGGGGTGATTCTAGTCAGACTCTGGGTTTGTGGTATAGAGGAAAAATCCACTATTGTGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAACATGGCCTCTCCAGGTCTTATTAAACCTTGTATGGAGTTCTGAGCATTGCAGAC
TAATCTGGATATTGTCCTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAACGTTGGAAATAACTGTCTAGGGATCTCAGAGCCTTAGGACAGATTATCT
CCACATCTTGAAGAAACTAAGAACATCTGTGTGATGGTGGAGTCCCTGGATGATGGGATAGGGACTTGGAGGCTCATTGAGGGAGA
TGCTAAAACAATCCTATGGCTGGAGGGATAGTTGGGCTGTAGTTGGAGATTTCAGTTAGAATAAAAGTATTAGTTGGAATATACTT
CAGGACCACCTCTGTGACAGCATTATACAGTATCCGATG (SEQ ID Nº: 127)
```

>Promotor J558H10 no AAV com anti-RSV murídeo

```
GACAAGTGAGTGCTCAGGTTAGGATTCTATTAAAGATTGAGATATTAGGCTTGATACTACATCTAAATGGCTGTACATGTCTCGAAGAAA
GTTCTCAGACAGAGTTAGGACTTGGATCCAGGAGTTAGGACTGGACTCAGGAGGACTCTAGTTCTCTCCAGCTGGAAATGTC
CTTATGTAAGAAAAGCCTGCCTCATGAGTATGCAAATCATGTGCGACTGTGATGATTAATATAGGGATATCCACACAAACATCATGAGC
CCTATCTCTCACAGACACTGAATCTCAAGGTCTTACA (SEQ ID Nº: 128)
```

>Sequência de codificação do peptídeo de sinal no AAV com anti-RSV murídeo

```
ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGGGTGCTCTTGGGTGCCCGAACAGCACAGGC (SEQ ID Nº: 129)
```

>Sequência de codificação da cadeia leve kappa do mRSV no AAV com anti-RSV murídeo

```
ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGGGTGCTCTTGGGTGCCCGAACAGCACAGGCACATCCAGCTGACACAGAGCCCTGCCATC
ATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGTTCCGCCAGCAGCTCCGTGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAAGTCTAGCA
CAAGCCCCAAGCTGGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTGGCGTGCCAGGCAGATTCTGGAAGCAGGGCAGCGGCAACAGCTACA
GCCTGACTATCAGCTCCATCCAGGCCGAGGATGTGGTACCTACTACTGCTTCAGAGGCAGCGGCTACCCCTCACATTGGCCAGGGCAC
CAAGCTGGAAATCAAGGCCGATGCCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCACCTAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCTGCTG
TGCTTCTGAACAACCTACCCCTAAGGACATCAACGTCAGTGGAAAGATCGACGGCTCCGAGAGACAGAACGGCGTGAACACTCTTGG
CCGACCAGGACAGCAAGGATAGCACCTACAGCATGAGCAGCACTTGACCCCTGACAAAGGACGAGTACGAGAGGGACAACACTCCTACACAT
GCGAGGCCACACACAAGACCAGCACATCCCCAATGTGAAGTCCTCAACCGGAACGAGTC (SEQ ID Nº: 130)
```

FIG. 25C (continuação)

>Sequência de codificação da cadeia leve variável do mPalivizumabe no AAV com emAb anti-RSV murídeo
 GACATCCAGCTGACACAGAGCCCTGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGTTCCGCCAGCAGCTCCGTGGGC
 TACATGCACTGGTATCAGCAGAAGTCTAGCACAAGCCCCAACGCTGTGGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTGGCGTGCCAGGCAGAT
 TTTCTGGAAAGCGGCAGCGCAACAGCTACAGCCTGACTATCAGCTCCATCCAGGCCGAGGATGTGGCTACCTACTGCTTCAGAGGCAG
 CGGCTACCCCTTCACATTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG (SEQ ID Nº: 131)

>Sequência de codificação da cadeia leve constante kappa do mlgL no AAV com emAb anti-RSV murídeo
 GCCGATGCCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCACCTAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCTGTCGTGCTTCCTGAACAACT
 TCTACCCTAACCGACATCAACGTCAAGTGGAAAGATCGACGGCTCCGAGAGACAGAACGGCGTGCTGAACCTTGGACCGACCAGGACAGCA
 AGGATAGCACCTACAGCATGAGCAGCACTCTGACCCCTGACAAAGGACGAGTACCGAGAGGCACAACCTACACATGCGAGGCCACACACAA
 GACCAGCACATCCCCAACCGTGAAGTCCTCAACCGAACGAGTGC (SEQ ID Nº: 132)

>A sequência de codificação do ligante GSSG-streptag no AAV com emAb anti-RSV murídeo é a SEQ ID Nº: 116

>Sequência de codificação da cadeia pesada variável do mPalivizumabe no AAV com emAb anti-RSV murídeo
 CAGGTGGAACTGCAAGAAAGCGGCCCTGGCATTGCAGCCTCTCAGACACTGAGCCTGACCTGAGCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGC
 ACAAGCGGCATGTCTGTCGGCTGGATCAGACAGCCTCTGGCGAAGGACTGGAATGGCTGGCGACATTGGTGGACACAAGAAGGAC
 TACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGACTGACCATCAGCAAGGACACCAGCAGCAACCAGGTGTTCTGAAGATCACCGCGTGGACACAGCC
 GATACCGCCACCTATTACTGCGCCAGATCCATGATCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCTGGCACACAGTGACCGTCTCCTCA
 (SEQ ID Nº: 133)

>Sequência de aminoácidos do peptídeo de sinal no AAV com emAb anti-RSV murídeo
 METDTLLLWVLLWVPGSTG (SEQ ID Nº: 134)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve kappa do mRSV no AAV com emAb anti-RSV murídeo
 METDTLLLWVLLWVPGSTGDIQLTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSSVGYMHWYQQKSSTSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGNSYSLTIS
 SIQAEDVATYYCFRGSGYPFTFGQGTKLEIKADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLNSWTQDSKDSTY
 SMSSTLTKEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFRNEC (SEQ ID Nº: 135)

FIG. 25C (continuação)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve variável do mPalivizumabe no AAV com emAb anti-RSV murídeo
DIQLTQSPAAMSASPGEKVTMTCSSVGYMHWYQQKSSTSPKLWIYDTSKLASGVPGFRSGSGNSYSLTISSIQAEDVATYYCFRGSGYPF
TFGQGTKLEIK (SEQ ID Nº: 136)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve constante kappa do mIgL no AAV com emAb anti-RSV murídeo
ADAAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTQDSKDSTYSMSSTLTKEYERHNSYTCEATHKTSTS
PIVKSFNRNEC (SEQ ID Nº: 137)

>A sequência de aminoácidos do ligante GSSG-streptag no AAV com emAb anti-RSV murídeo é a SEQ ID Nº: 122

>Sequência de aminoácidos da cadeia pesada variável do mPalivizumabe no AAV com emAb anti-RSV murídeo

QVELQESGPGILQPSQTLSTCSFGSLSTGMSVGWIRQPSGEGLEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITGVDTADTATYY
CARSMITNWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID Nº: 138)

>Junção de *splice* com sequência flanqueadora no AAV com emAb anti-RSV murídeo

CAGGTGAGTCCTAACCTCTCCCATTCTAAATGCATGTTGGGGGGATTCTGGGCCTCAGGACCA (SEQ ID Nº: 139)

>Região a jusante do mB3 Balb/C murídeo no AAV com emAb anti-RSV murídeo

CATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGCACTTCTTAGATTGTGAGGAATGTTCCGCACTAGATTGTTAAAACCTCATTGTTGGAAAGGAGA
GCTGTCTTAGTGATTGAGTCAGGGAGAAAGGCATCTAGCCTCGGTCTCAAAGGGTAGTTGCTGTAGAGAGGTCTGGTGGAGCCTGCA
AAAGTCCAGCTTCAAAGGAACACAGAAGTATGTATGGAATTAGAAGATGTTGCTTTACTCTTAAGTTGGTTCTAGGAAAAATAGTTA
AATACTGTGACTTAAAATGTGAGAGGGTTCAAGTACTCATTTAAATGTCCAATCAGTTGAGGTCTTGTCAATTAGTT
GAAGTGATATTACTAAAGTTAACCGAGGAATGGGAGTGAGGCTCTCTCATAACCTATTCAAACACTGACTTTAACAAATAAAATTAAAGTT
AAAATTTAAATGAATTGAGCAATGTTGAGTTGGAGTCAGATGGCCGATCAGAACCCAGAACACCTGCAGCAGCTGGCAGGAAGCAGGT
CATGTGGCAAGGCATTTGGGAAGGGAAAATAAACCACTAGGTAAACTTGAGCTGTGGTTGAAGAAGTGGTTGAAACACTCTGTCC
AGCCCCACCAAACCGAAAGTCCAGGCTGAGCAAACACCACCTGGTAATTGCATTCTAAAATAAGTTGAGGATTAGCCGAAACTGGAG
AGGTCCCTTTAACCTATTGAGTTAACCTTTAATTAGCTTGAGTAGTTCTAGTTCCCCAACTTAAGTTATCGACTCTAAAATGTATT
TAGAATTCTTCAAAATTAGGTTATGTAAGAAATTGAAGGACTTACTGTCTTAATTCTAATATATTAGAAAATTCTTAAACTCT
TTATTCTCCCTCTGATTATTGGTCTCCATTCA (SEQ ID Nº: 140)

FIG. 25C (continuação)

>Sequência de codificação da cadeia leve kappa do mRSV sem sequência de sinal no AAV com emAb anti-RSV murídeo
GACATCCAGCTGACACAGAGCCCTGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGTTCCGCCAGCAGCTCCGTGGGC
TACATGCACTGGTATCAGCAGAAGTCTAGCACAAGCCCCAAGCTGTGGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCTGGCGTGCCAGGCAGAT
TTTCTGGAAGCGGCAGCGGCAACAGCTACAGCCTGACTATCAGCTCCATCCAGGCCGAGGATGTGGCTACCTACTACTGCTTCAGAGGCAG
CGGCTACCCCTTCACATTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGCCGATGCCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCACCTAGCAGCGAG
CAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCTGCGTGCTCTGAACAACTTCTACCCCTAAGGACATCAACGTCAAGTGGAAAGATCGACGGCTCCG
AGAGACAGAACGGCGTGTGAACTCTTGGACCGACCAGGACAGCAAGGATAGCACCTACAGCATGAGCAGCACTTGACCCCTGACAAAGG
ACGAGTACGAGAGGCACAACCTACACATGCGAGGCCACACACAAGACCAGCACATCCCCAATCGTAAGTCCTCAACCGGAACGAGTG
C (SEQ ID Nº: 281)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve kappa do mRSV no AAV com emAb anti-RSV murídeo
DIQLTQSPAAMSAPGEKVTMTCSASSSVGYMHWYQQKSSTSPKLWIYDTSKLASGVPGFSGSGNSYSLTISSIQAEDVATYYCFRGSGYPF
TFGQGTKLEIKADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLKDEYERHNSYT
CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID Nº: 286)

54/110

FIG. 25D (continuação)

ms-emAb-RSV-dsDNA (1.736 np)

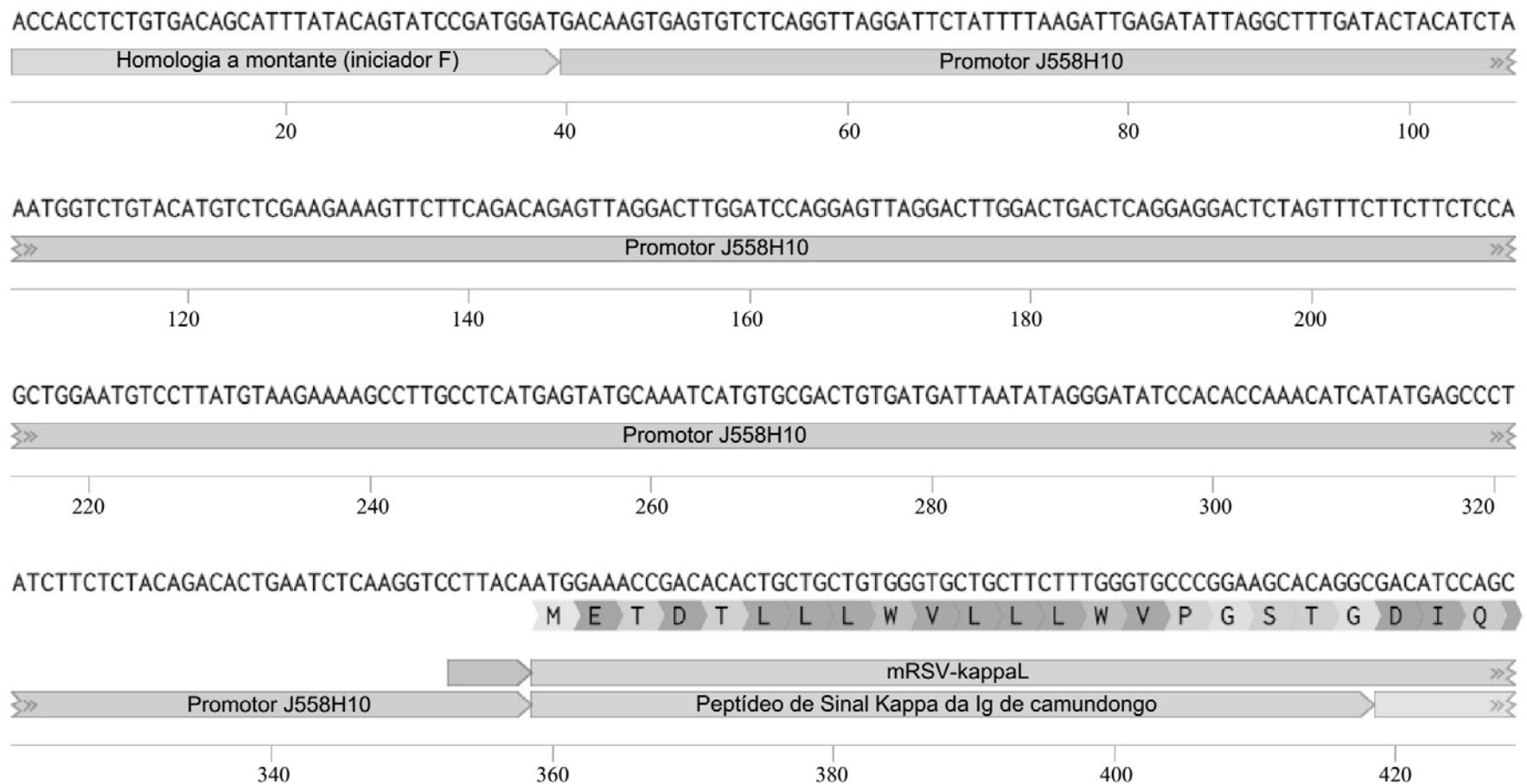


FIG. 25D (continuação)

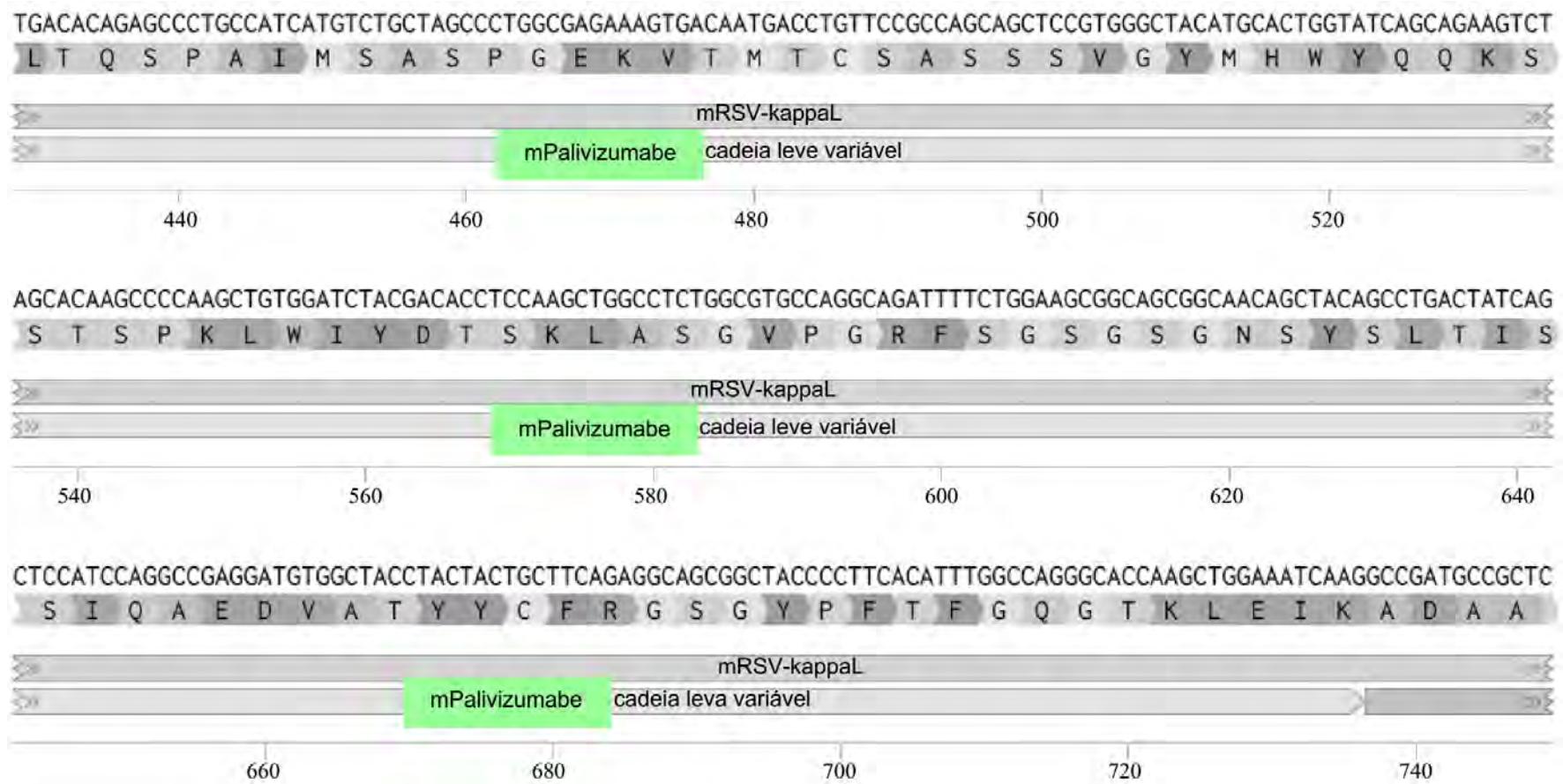


FIG. 25D (continuação)

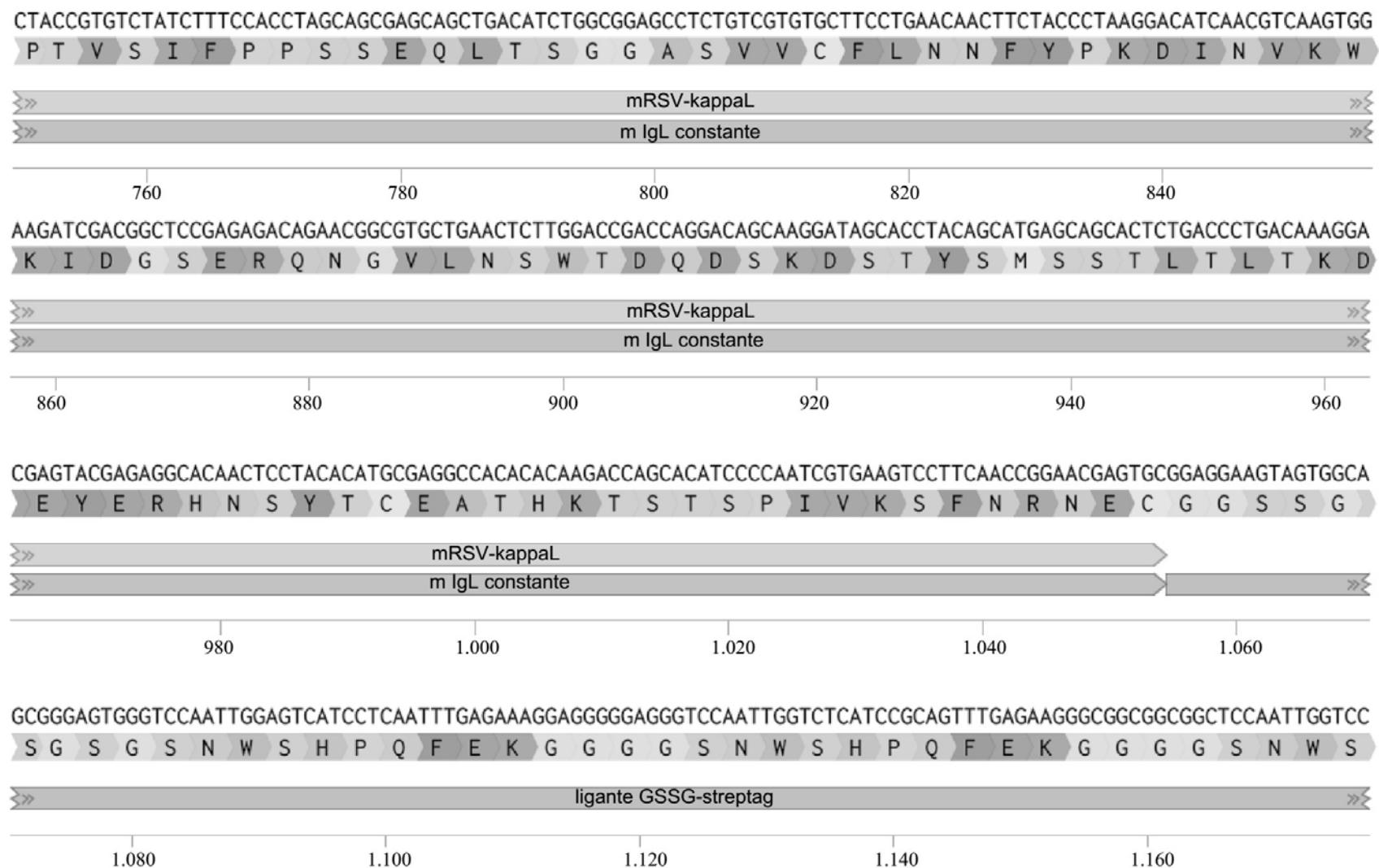


FIG. 25D (continuação)

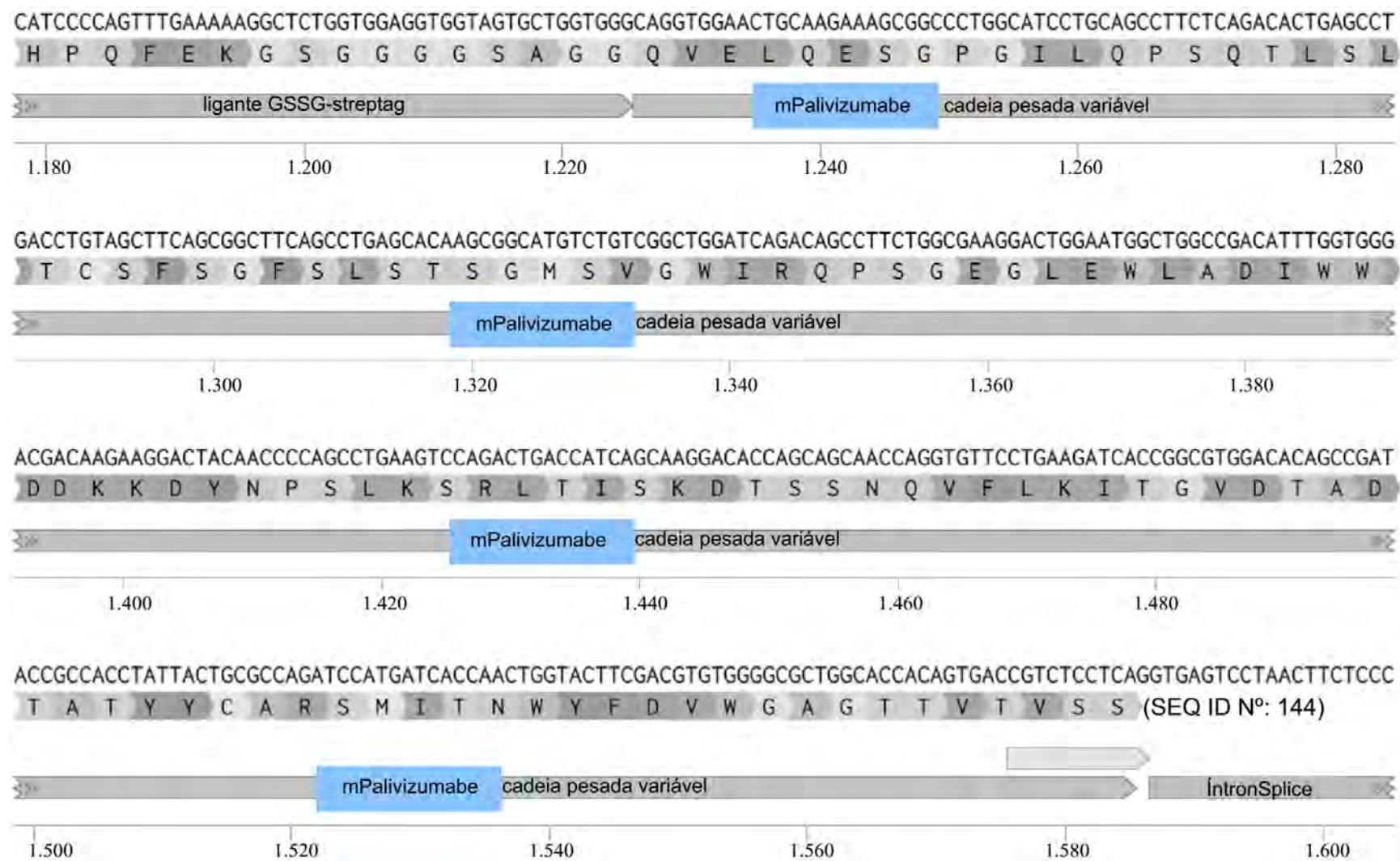


FIG. 25D (continuação)

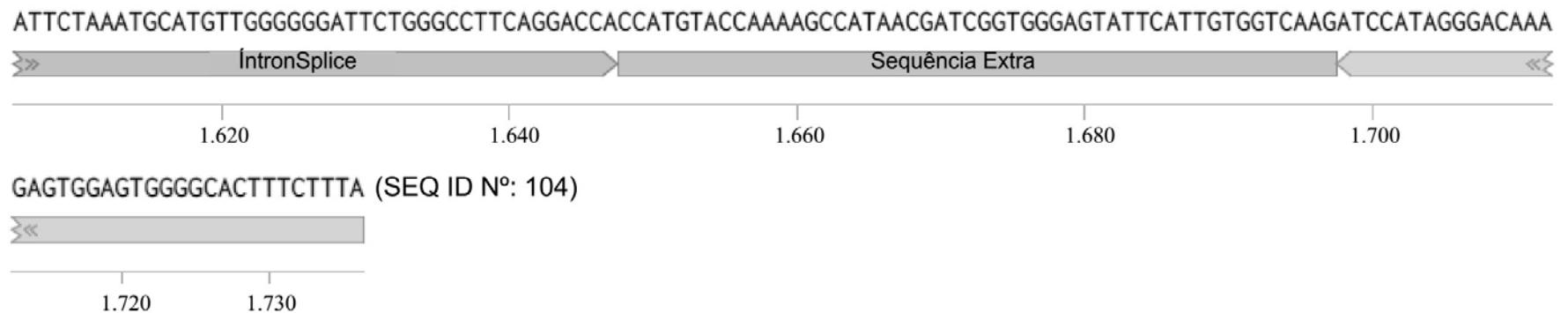


FIG. 25D (continuação)

>Sequência de homologia a montante (iniciador F) no ms-emAb-RSV-dsDNA

ACCACCTCTGTGACAGCATTATACAGTATCCGATGGAT (SEQ ID Nº: 142)

>O promotor J558H10 no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 128

>A sequência de codificação do peptídeo de sinal no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 129

>A sequência de codificação da cadeia leve do mPalivizumabe no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 130

>A sequência de codificação da cadeia leve variável do mPalivizumabe no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 131

>A sequência de codificação da cadeia leve constante kappa do mPalivizumabe no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 132

>A sequência de codificação do ligante GSSG-streptag no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 116

>A sequência de codificação da cadeia pesava variável do mPalivizumabe no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 133

>A sequência de aminoácidos do peptídeo de sinal no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 134

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve do mPalivizumabe no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 135

>A sequência de aminoácidos de cadeia leve variável do mPalivizumabe no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 136

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve constante kappa do mPalivizumabe no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 137

>A sequência de aminoácidos do ligante GSSG-streptag no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 122

>A sequência de aminoácidos da cadeia pesada variável do mPalivizumabe no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 138

>A junção de *splice* com sequência flankeadora no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 139

>Sequência de homologia a jusante no ms-emAb-RSV-dsDNA

ATCCATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTCTTTA (SEQ ID Nº: 143)

>Sequência de codificação da cadeia leve do mPalivizumabe sem sequência de sinal no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 281

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve do mPalivizumabe sem o peptídeo de sinal no ms-emAb-RSV-dsDNA é a SEQ ID Nº: 286

60/110

FIG. 25E

hu-emAb-VRC01-AAV (2.551 bp)

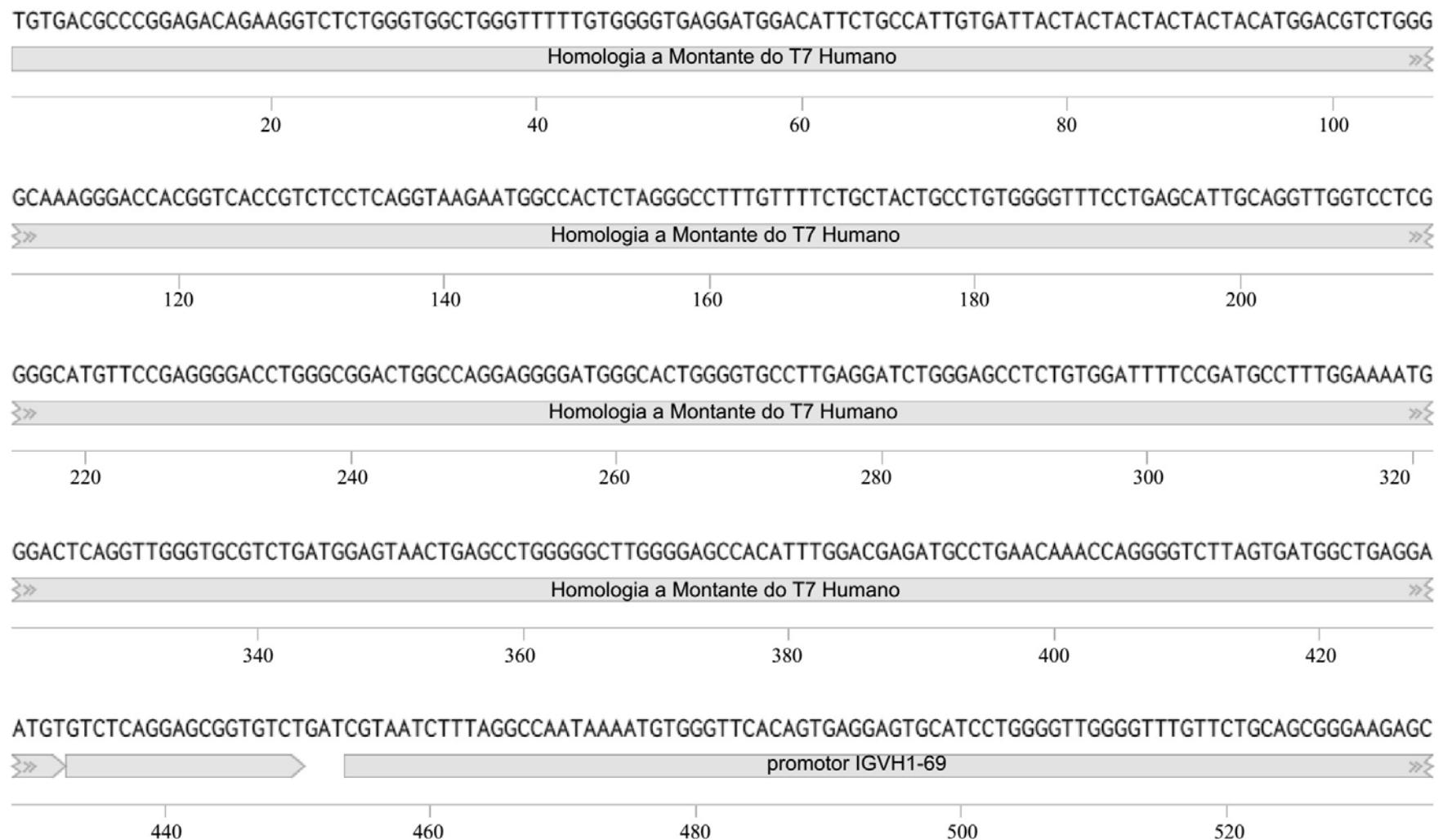


FIG. 25E (continuação)

GCTGTGACAGAAAGCTTAGAAATGGGGCAAGAGATGCTTTCCCTCAGGCAGGATTAGGGCTGGCTCTCAGCATCCCACACTTGTACAGCTGTGGCATCTG

promotor IGVH1-69

540 560 580 600 620 640

TGTTTCTTCATCCTAGATCAGGTTTGAGCTGTAAAATACCCGCCTCATGCATATGCAAATAACTGAGGTTCTGAGATAAAATAGATAATTGGTCC

promotor IGVH1-69

CTGAGggcatcacGGCCGCCACCATGGCTACCGGCAGCAGAAACAAGCCTGCTGCTCGCTTTGGACTGCTCTGTCTCCCCCTGGTTCAGAAGGCAAGGAGCGGCCGAAATTG

M A T G S R T S E L L A F G C I P W L Q E G S A E T

VRC01-cadeia leve

Peptídeo de Sinal

760 780 800 820 840

TGTTGACACAGTCTCCAGGCACCTGTCTTGTCAGGGAAACAGCCATCATCTTGTGGACCAGTCAGTATGGTTCTTAGCCTGGTATCAACAGAGGCC

V L T Q S P G T L S L S P G E T A I I S C R T S Q Y G S L A W Y Q Q R P

VRC01-cadeia leve

VRC01-Leve-variável

FIG. 25E (continuação)

GGCCAGGCCCCCAGGCTCGTCATCTATTGGGCTACTCGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGCGGCAGTCGGTGGGGGCCAGACTACAATCTCACCATCAG
 G Q A P R L V I Y S G S T R A A G I P D R F S G S R W G P D Y N L T I S

VRC01-cadeia leve

VRC01-Leve-variável

980 1.000 1.020 1.040 1.060

CAACCTGGAGTCGGAGATTTGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGAATTTTGCCAGGGGACCAAGGTCCAGGTCGACATTAAGCGCactgtggccgctccta
 N L E S G D F G V Y Y C Q Q Y E F F G Q G T K V Q V D I K R T V A A P

VRC01-cadeia leve

VRC01-Leve-variável

1.080 1.100 1.120 1.140 1.160

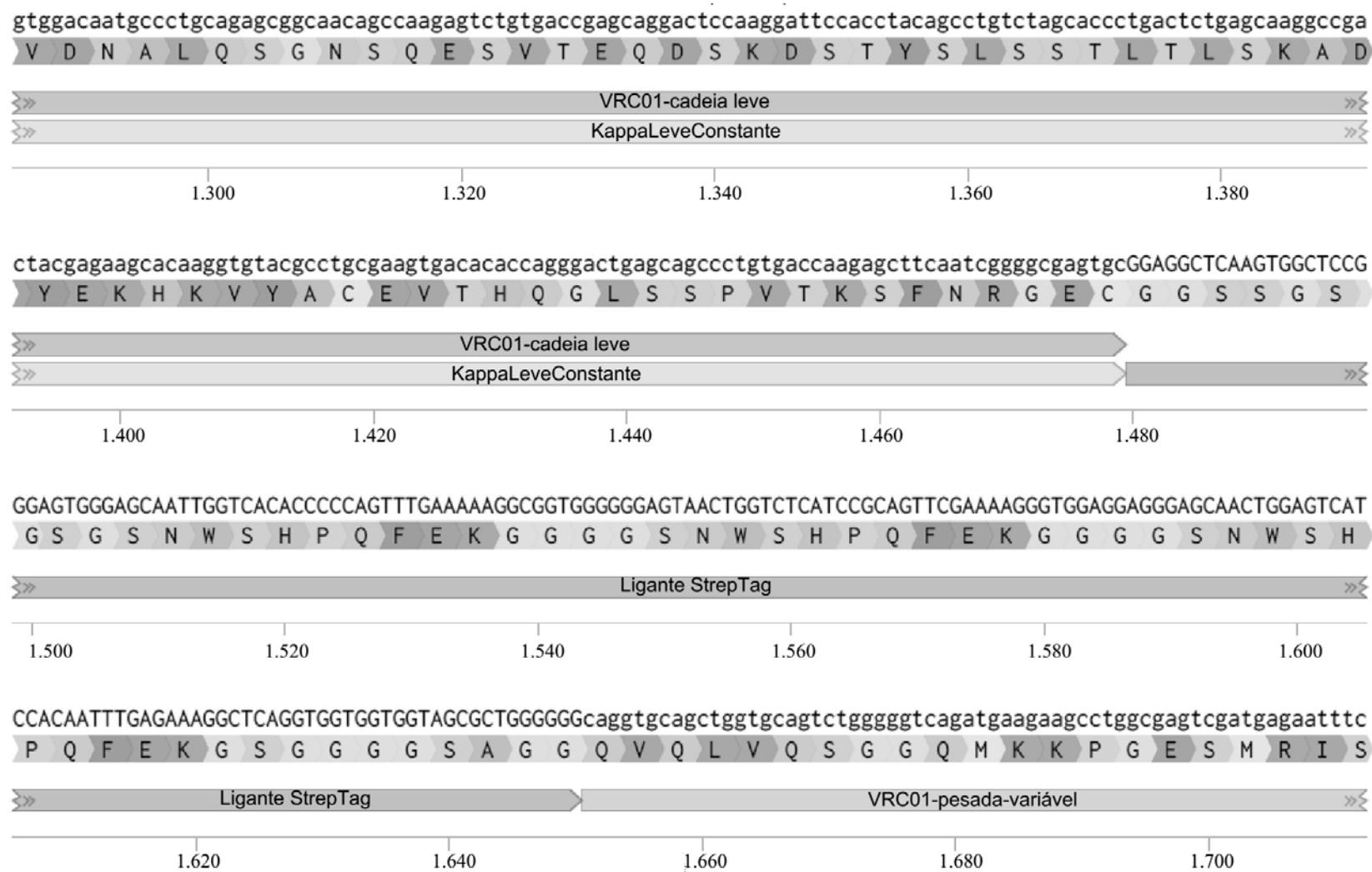
gcgtttcatttcacctagcgacgaggcagctgaagtctggcactgcctctgtcggtgcctgctgaacaacttctaccctcgagaggccaagggtgcagtggaaa
 S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K

VRC01-cadeia leve

KappaLeveConstante

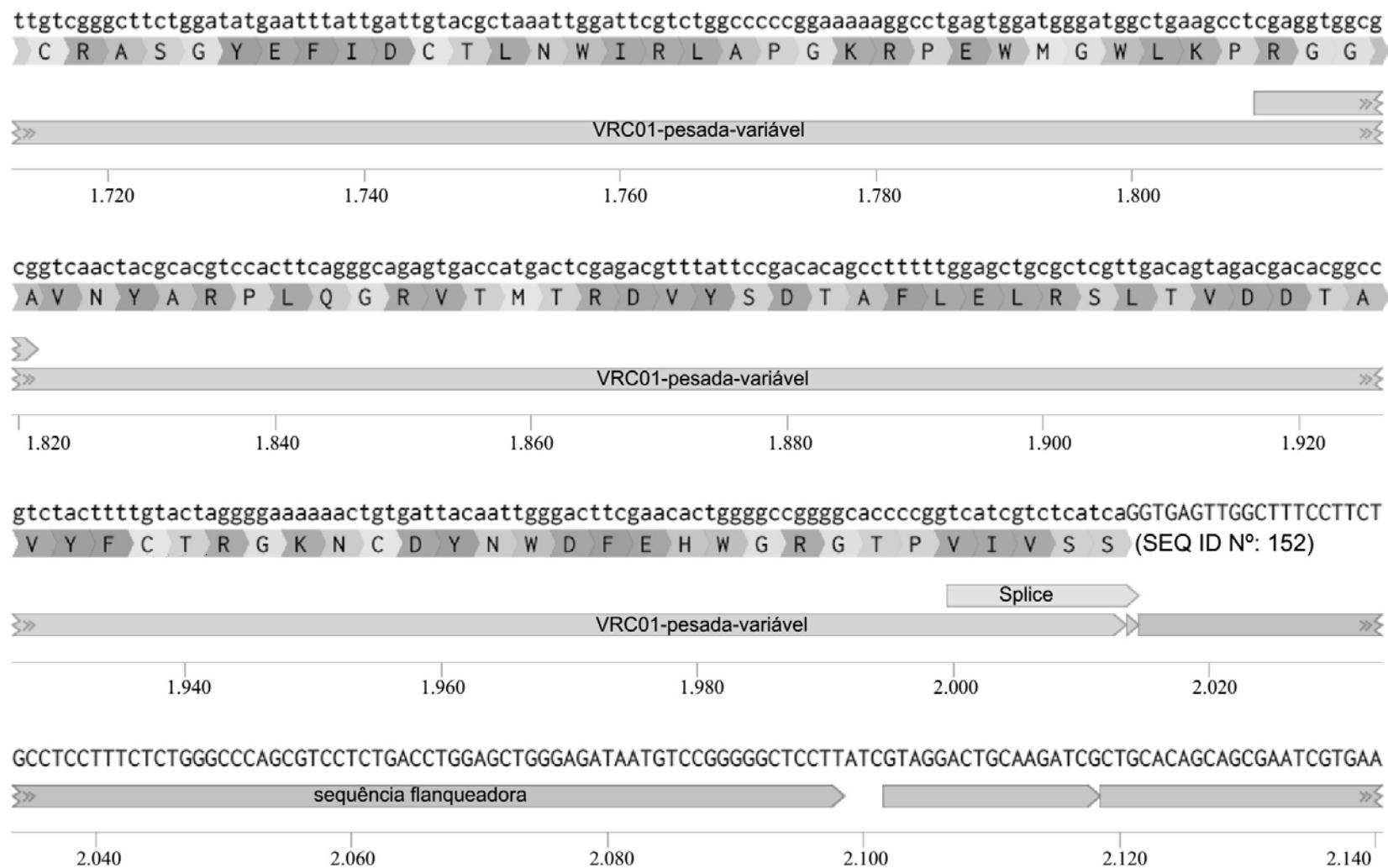
1.180 1.200 1.220 1.240 1.260 1.280

FIG. 25E (continuação)



64/110

FIG. 25E (continuação)



65/110

FIG. 25E (continuação)

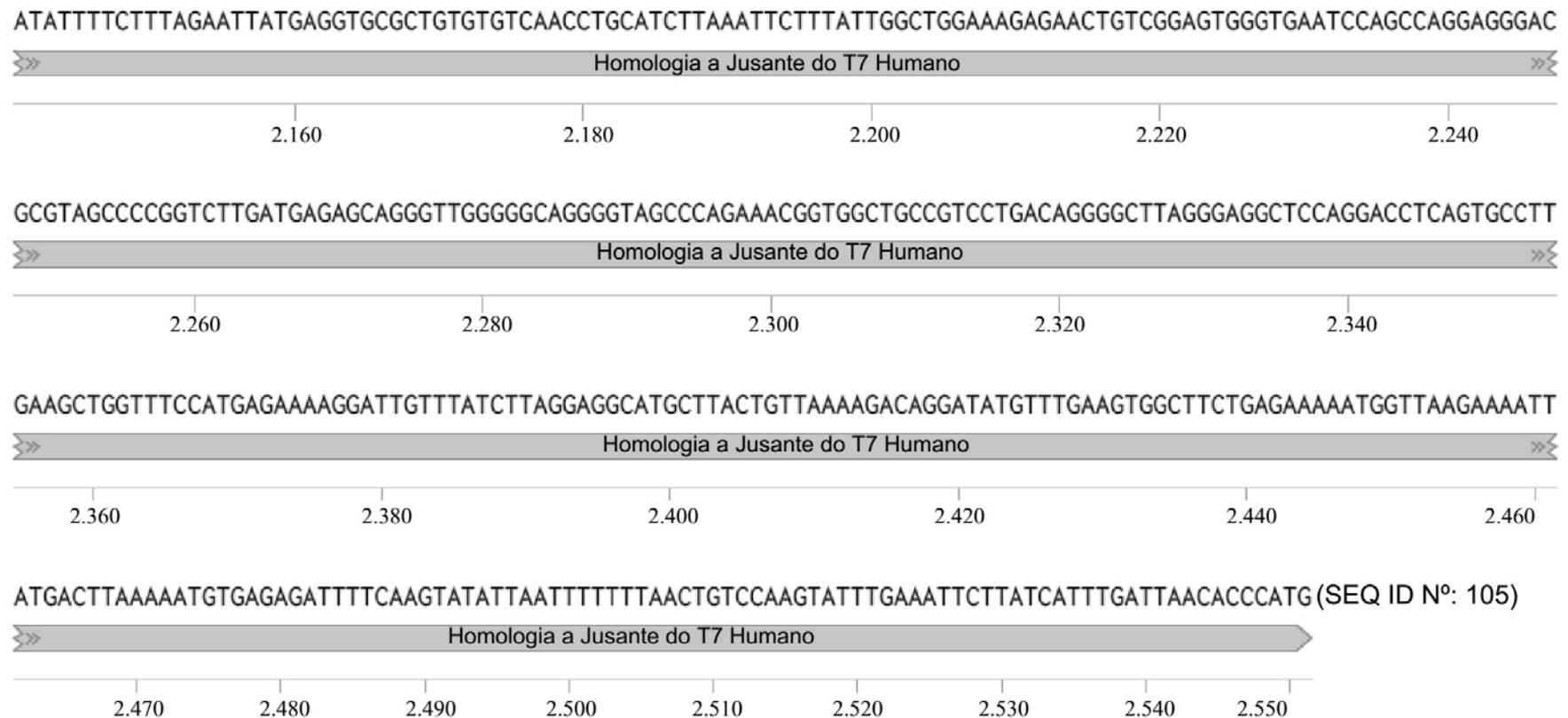


FIG.25E (continuação)

>A homologia a montante do T7 humano no Hu-emAb-VRC01-AAV é a SEQ ID Nº: 110

>O promotor IgVH1-69 no Hu-emAb-VRC01-AAV é a SEQ ID Nº: 111

>A sequência de codificação do peptídeo de sinal no Hu-emAb-VRC01-AAV é a SEQ ID Nº: 112

>Sequência de codificação da cadeia leve do VRC01 no Hu-emAb-VRC01-AAV

ATGGCTACCGGCAGCAGAACAAAGCTGCTCGCTTGGACTGCTCTGTCTCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCGAAATTGTGTTGA
CACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTGCTCCAGGGAAAACAGCCATCATCTTGTGGACAGTCAGTATGGTCTTAGCCTGGTATCAA
CAGAGGCCCGGCCAGGCCAGGCCCCCAGGCTCGTCATCTATTGGCTACTCGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGCGGCAGTCGGTG
GGGGCCAGACTACAATCTCACCCTCAGAACCTGGAGTCGGGAGATTTGGTTATTATTGCCAGCAGTATGAATTGGCCAGGGGA
CCAAGGTCCAGGTCGACATTAAGCGCACTGTGGCCGCTCTAGCGTGTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACTGC
CTCTGCGTGTGCCTGCTGAACAACCTCTACCCCTCGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
AGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACCTACAGCCTGCTAGCACCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG
GTGTACGCCCTGCGAAGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTCAATGGGGCGAGTGC (SEQ ID Nº: 145)

>Sequência de codificação da cadeia leve variável do VRC01 no Hu-emAb-VRC01-AAV

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTGCTCCAGGGAAAACAGCCATCATCTTGTGGACAGTCAGTATGGTCTT
AGCCTGGTATCAACAGAGGCCCGGCCAGGCCAGGCCCCCAGGCTCGTCATCTATTGGCTACTCGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTCA
CGGCAGTCGGTGGGGCCAGACTACAATCTCACCCTCAGAACCTGGAGTCGGGAGATTTGGTTATTATTGCCAGCAGTATGAATT
TTGGCCAGGGACCAAGGTCCAGGTCGACATTAAGCGC (SEQ ID Nº: 146)

>A sequência de codificação da cadeia leve constante kappa no Hu-emAb-VRC01-AAV é a SEQ ID Nº: 115

>A sequência de codificação do ligante GSSG-streptag no Hu-emAb-VRC01-AAV é a SEQ ID Nº: 116

>Sequência de codificação da cadeia pesada variável do VRC01 no Hu-emAb-VRC01-AAV

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGTCAGATGAAGAACGCCTGGCGAGTCGATGAGAATTCTTGTGGGCTCTGGATATGAATTATTG
ATTGTACGCTAAATTGGATTCTGCTGGCCCCGGAAAAAGGCCCTGAGTGGATGGATGGCTGAAGCCTCGAGGTGGCGCGTCAACTACG
CACGTCCACTTCAGGGCAGAGTGACCATGACTCGAGACGTTATTCCGACACAGCCTTTGGAGCTGCGCTCGTTGACAGTAGACGACAC
GGCGTCACTTTGACTAGGGAAAAACTGTGATTACAATTGGACTTCGAACACTGGGCCGGGCACCCGGTCATCGTCTCATCA
(SEQ ID Nº: 147)

FIG. 25E (continuação)

>A sequência de aminoácidos do peptídeo de sinal no Hu-emAb-VRC01-AAV é a SEQ ID Nº: 118

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve do VRC01 no Hu-emAb-VRC01-AAV

MATGSRTSLLAFLCLPWLQEGSAEIVLTQSPGTLSPGETAIISCRTSQYGS LAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGP DYN LTISNLESGDFGVYYCQQYEFFGQGKTVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID Nº: 148)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve variável do VRC01 no Hu-emAb-VRC01-AAV

EIVLTQSPGTLSPGETAIISCRTSQYGS LAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGP DYNLTISNLESGDFGVYYCQQYEFFGQG KTVQVDIKR (SEQ ID Nº: 149)

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve constante kappa no Hu-emAb-VRC01-AAV é a SEQ ID Nº: 121

>A sequência de aminoácidos do ligante GSSG-streptag no Hu-emAb-VRC01-AAV é a SEQ ID Nº: 122

>Sequência de aminoácidos da cadeia pesada variável do VRC01 no Hu-emAb-VRC01-AAV

QVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPRGGAVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTA FLELRSLTVDD TAV YFCTRGNCDYNWDFEHWGRGTPVIVSS (SEQ ID Nº: 150)

>Junção de *splice* com sequência flanqueadora em constructos da invenção

CAGGTGAGTTGGCTTCCTCTGCCTCCTCTGGGCCAGCGTCCTTGACCTGGAGCTGGAGATAATGTCCGGGGCTCCTT (SEQ ID Nº: 151)

>A homologia a jusante do T7 humano no Hu-emAb-VRC01-AAV é a SEQ ID Nº: 125

FIG. 25E (continuação)

>Sequência de codificação da cadeia leve do VRC01 no Hu-emAb-VRC01-AAV
GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCGTCTTGCTCCAGGGAAACAGCCATCATCTCTTGTGGACCAGTCAGTATGGTTCTT
AGCCTGGTATCAACAGAGGCCCGGCCAGGCCCGAGGCTCGTCATCTATTGGCTACTCGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTCA
CGGCAGTCGGTGGGGCCAGACTACAATCTACCATCAGCAACCTGGAGTCGGAGATTGGTATTATTGCCAGCAGTATGAATTT
TTGGCCAGGGGACCAAGGTCAGGTCGACATTAAGCGCACTGTGGCCGCTCTAGCGTGTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAA
GTCTGGCACTGCCCTGTGCGTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCTCGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAG
CGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACCTACAGCCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTA
CGAGAACACAAGGTGTACGCCCTCGAAGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATGGGGCGAGTGC (SEQ
ID Nº: 282)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve do VRC01 sem peptídeo de sinal no Hu-emAb-VRC01-AAV
EIVLTQSPGTLSSLSPGETAIISCRTSQYGS LAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGRWGPDYNLTISNLES GDFGVYYCQQYEFFGQGT
KVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTL SKADYEHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID Nº: 287)

69/110

FIG. 25F

hu-emAb-Medi8852-AAV (2.544 bp)

TGTGACGCCGGAGACAGAAGGTCTCTGGGTGGCTGGGTTTGTGGGGTGAGGATGGACATTCTGCCATTGTGATTACTACTACTACATGGACGTCTGGG

Homologia a Montante do T7 Humano



20

40

60

80

100

GCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAAGAATGGCCACTCTAGGGCCTTGTCTGCTACTGCCTGTGGGGTTCTGAGGGCATGTTCCGAGGGGACC



Homologia a Montante do T7 Humano



120

140

160

180

200

TGGGCGGACTGGCCAGGAGGGATGGGCACTGGGGTGCCTTGAGGATCTGGAGCCTCTGGGATTTCCATGCCTTGAAAATGGACTCAGGTTGGTGCCTC



Homologia a Montante do T7 Humano



220

240

260

280

300

320

TGATGGAGTACTGAGCCTGGGGCTTGGGAGCCACATTGGACGAGATGCCTGAACAAACCAGGGTCTTAGTGATGGCTGAGGAATGTGTCTCAGGAGCGGTGT



Homologia a Montante do T7 Humano



340

360

380

400

420

CTGATCGTAATCTTAGGCCATAAAATGTGGGTTCACAGTGAGGAGTGCATCCTGGGTTGGGTTCTGCAGCGGAAGAGCGCTGTGCACAGAAAGCTTAG



Promotor IgVH1-69



440

460

480

500

520

70/110

FIG. 25F (continuação)

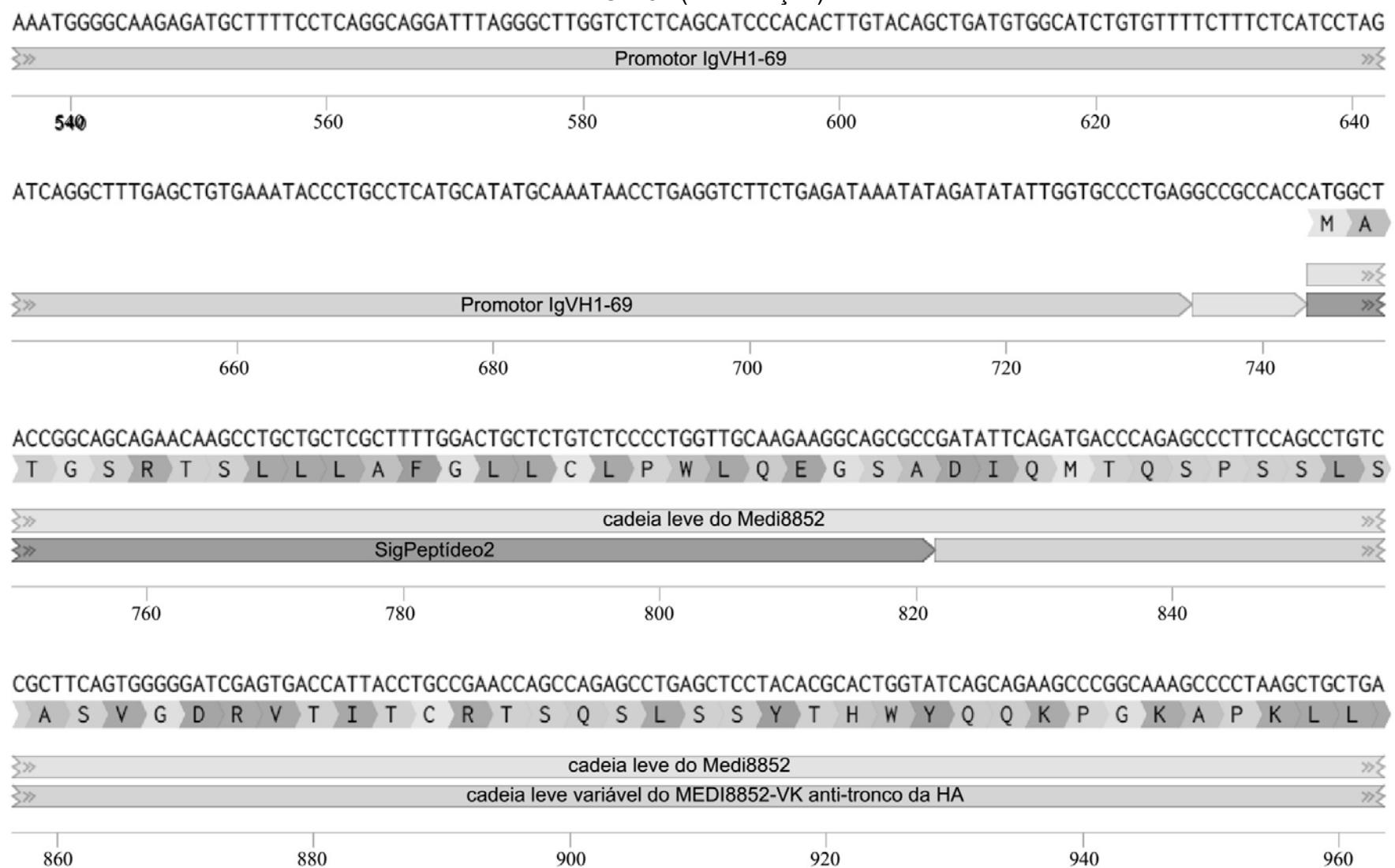


FIG. 25F (continuação)

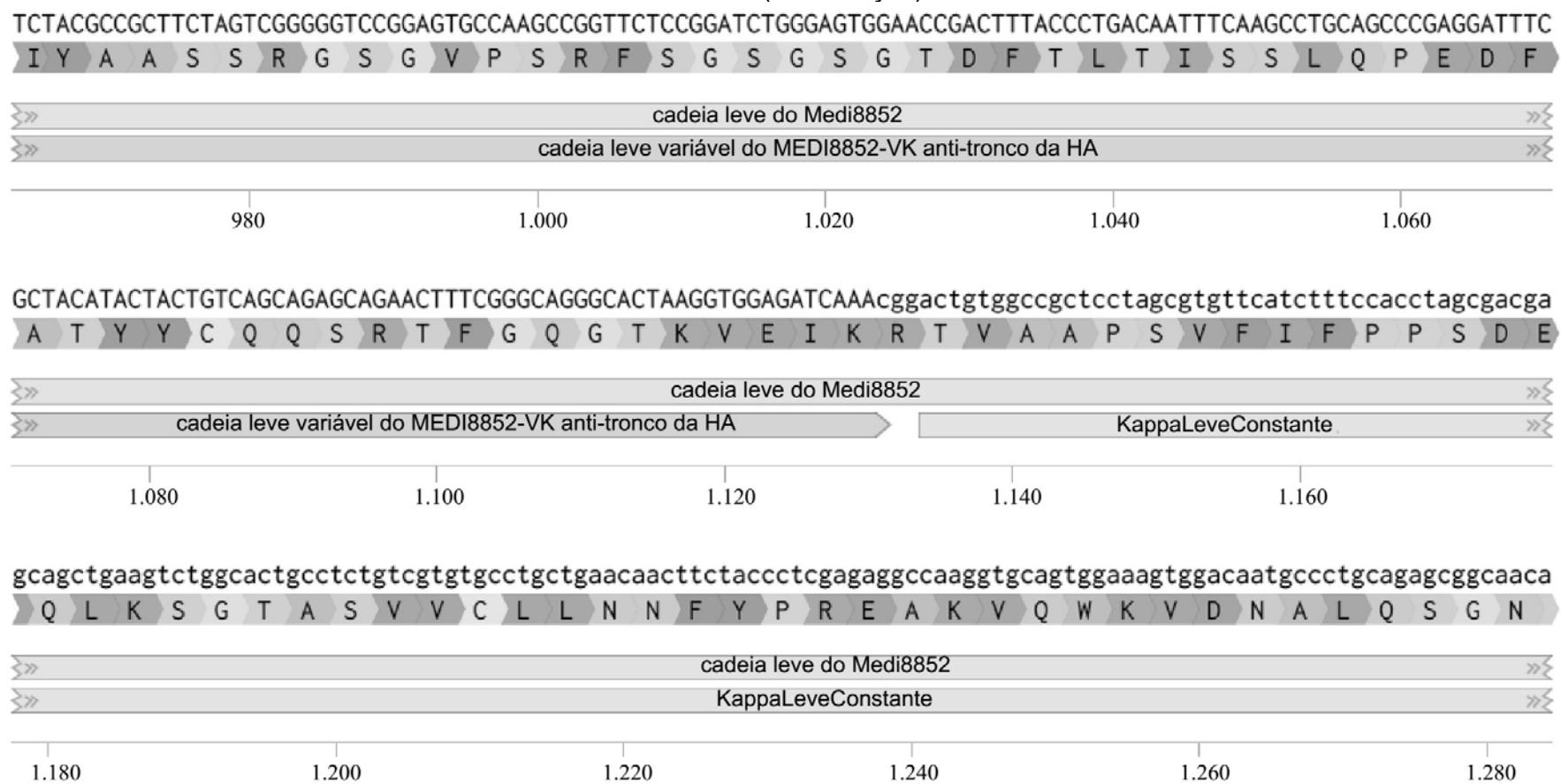


FIG. 25F (continuação)

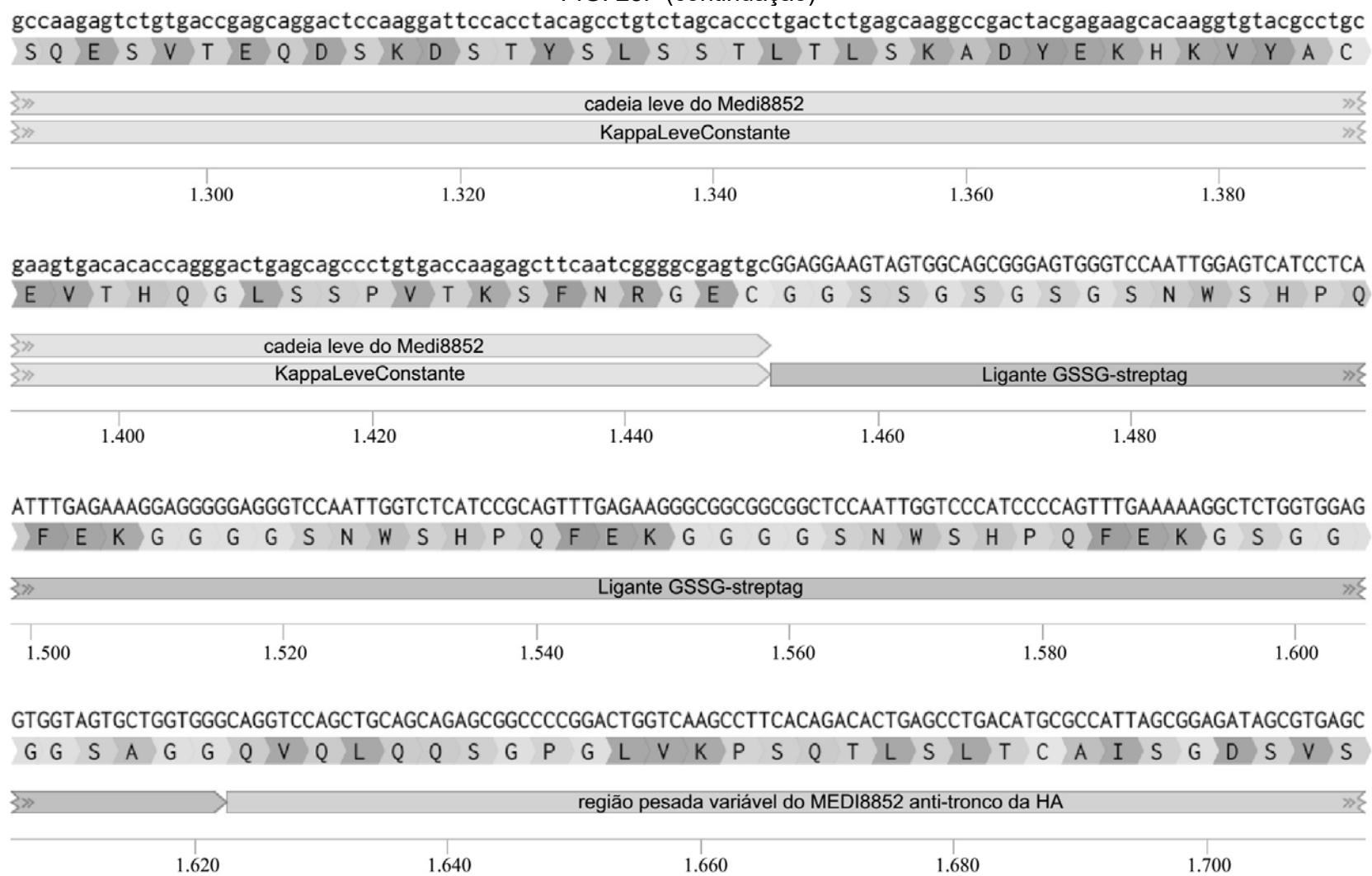


FIG. 25F (continuação)

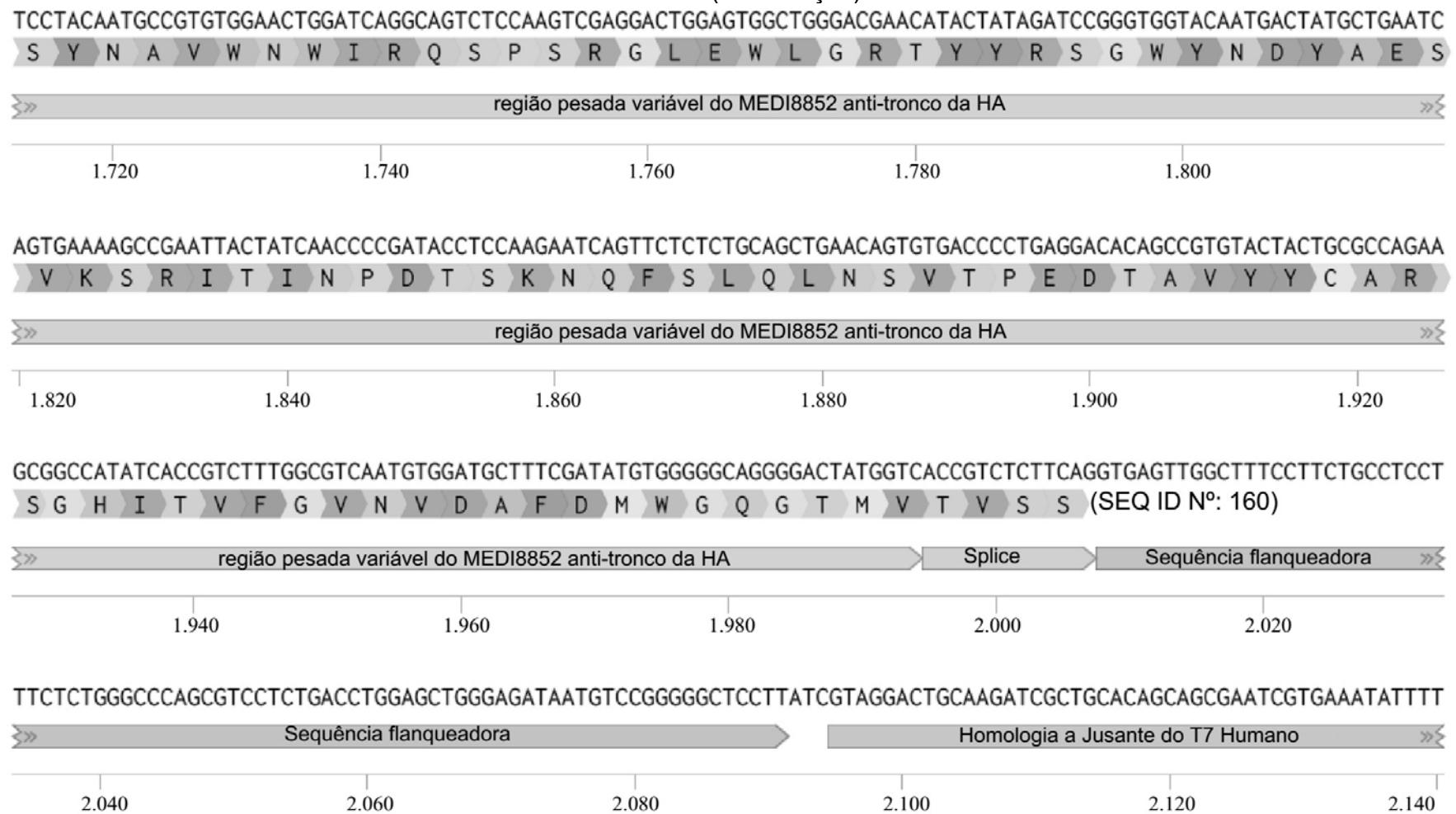


FIG. 25F (continuação)

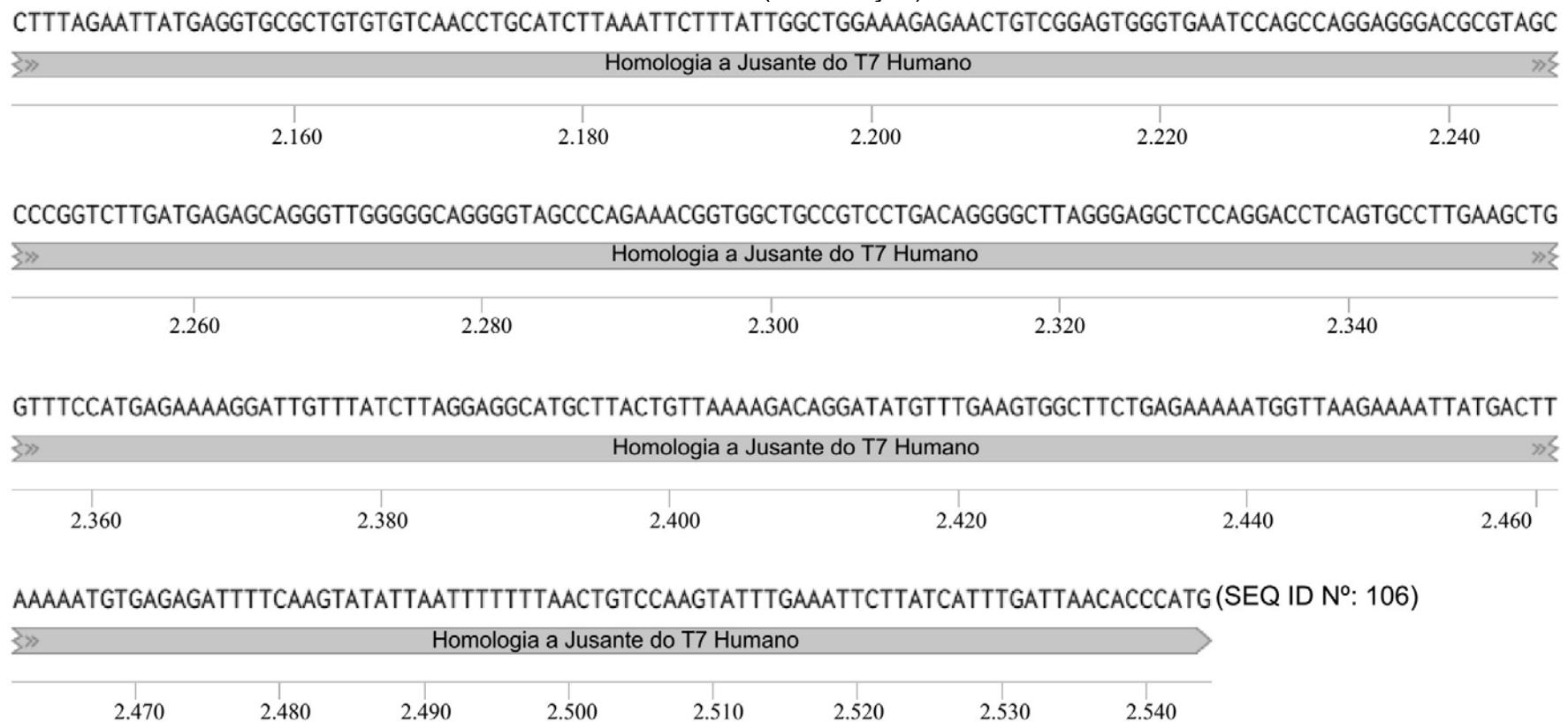


FIG. 25F (continuação)

>Região de homologia a montante do T7 humano em constructos da invenção

TGTGACGCCCGGAGACAGAAAGGTCTCTGGGTGGCTGGGTTTGTGGGTGAGGATGGACATTCTGCCATTGTGATTACTACTACTAC
TACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAAGAATGCCACTCTAGGGCCTTGTGCTACTGCCCTGT
GGGGTTTCCTGAGGGCATTTCCGAGGGGACCTGGCGGACTGCCAGGAGGGATGGCACTGGGTGCCTGAGGATCTGGAGCC
TCTGTGGATTTCCGATGCCCTGGAAAATGGGACTCAGGTTGGGTGCGTCTGATGGAGTAAC TGAGCCTGGGGCTGGGAGCCACATT
TGGACGAGATGCCGAACAAACCAGGGGTCTTAGTGATGGCTGAGGAATGTGTCAGGAGCGGTGTCT (SEQ ID Nº: 153)

>O promotor IgVH1-69 no hu-emAb-Medi8852-AAV é a SEQ ID Nº: 111

>A sequência de codificação do peptídeo de sinal no hu-emAb-Medi8852-AAV é a SEQ ID Nº: 112

>Sequência de codificação da cadeia leve do Medi8852 no hu-emAb-Medi8852-AAV

ATGGCTACCGGCAGCAGAACAAAGCCTGCTGCTCGCTTGGACTGCTCTGTCTCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGGCCGATATTAGATGA
CCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCGCTCAGTGGGGATCGAGTGACCATTAACCTGCCAACAGCCAGGCCAGCTGAGCTCCTACACGCACT
GGTATCAGCAGAACGCCGGCAAAGCCCCTAACGCTGCTGATCTACGCCCTCTAGTCGGGGTCCGGAGTGCCAAGCCGGTTCTCCGGAT
CTGGGAGTGGAAACCGACTTACCCGACAATTCAAGCCTGCAAGCCGAGGATTTCGCTACATACTACTGTCAGCAGAGCAGAACATTCCG
GCAGGGACTAAGGTGGAGATCAAACGGACTGTGGCGCTCTAGCGTGTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACT
GCCTCTGCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCTCGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCAGCAACAGC
CAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACCTACAGCCTGCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAACACA
AGGTGTACGCCCTGCGAAGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTCAATGGGGCGAGTGC (SEQ ID Nº: 154)

>Sequência de codificação da cadeia leve variável do MEDI8852-VK anti-HA tronco no hu-emAb-Medi8852-AAV

GATATTAGATGCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCGCTCAGTGGGGATCGAGTGACCATTAACCTGCCAACAGCCAGAGCCTGAGCT
CCTACACGCCTGGTATCAGCAGAACGCCGGCAAAGCCCCTAACGCTGCTGATCTACGCCCTCTAGTCGGGGTCCGGAGTGCCAAGCC
GGTTCTCCGGATCTGGAGTGGAAACCGACTTACCCGACAATTCAAGCCTGCAAGCCGAGGATTTCGCTACATACTACTGTCAGCAGAG
CAGAACATTCCGGCAGGGCACTAAGGTGGAGATCAA (SEQ ID Nº: 155)

>A sequência de codificação da cadeia leve constante kappa no hu-emAb-Medi8852-AAV é a SEQ ID Nº: 115

>A sequência de codificação do ligante GSSG-streptag no hu-emAb-Medi8852-AAV é a SEQ ID Nº: 116

FIG. 25F (continuação)

>Sequência de codificação da cadeia pesava variaável do anti-HA-tronco no hu-emAb-Medi8852-AAV
CAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGGCCCCGGAAGTGGTCAGCCTCACAGACACTGAGCCTGACATGCGCCATTAGCGGAGATAGCGTGAGC
TCCTACAATGCCGTGTGGAAGTGGATCAGGCAGTCTCCAAGTCGAGGACTGGAGTGGCTGGACGAACATACTATAGATCCGGGTGGTACA
ATGACTATGCTGAATCAGTAAAAGCCGAATTACTATCAACCCCGATACTCCAAGAACATAGTTCTCTGCAGCTGAACAGTGTGACCCCT
GAGGACACAGCCGTGTACTACTGCCAGAAGCGGCCATATCACCCTGGCGTCAATGTGGATGCTTCGATATGTGGGGCAGGGG
ACTATGGTCACCGTCTCTCA (SEQ ID Nº: 156)

>A sequência de aminoácidos do peptídeo de sinal no hu-emAb-Medi8852-AAV é a SEQ ID Nº: 118

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve do Medi8852 no hu-emAb-Medi8852-AAV
MATGSRSTLLAFGLLCLPWLQEGSADIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRTSQLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRGSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSRTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID Nº: 157)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve variável do MEDI8852-VK anti-HA-tronco no hu-emAb-Medi8852-AAV
DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRTSQLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSRTFGQ
GTKVEIK (SEQ ID Nº: 158)

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve constante kappa no hu-emAb-Medi8852-AAV é a SEQ ID Nº: 121

>A sequência de aminoácidos do ligante GSSG-streptag no hu-emAb-Medi8852-AAV é a SEQ ID Nº: 122

>Sequência de aminoácidos da cadeia pesava variável do anti-HA-tronco no hu-emAb-Medi8852-AAV
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSYNAVWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSGWYNDYAESVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA
VYYCARSGHITVFGNVDAFDMWGQGTMVTVSS (SEQ ID Nº: 159)

>A junção de *splice* com sequência flankeadora no hu-emAb-Medi8852-AAV é a SEQ ID Nº: 151

>A homologia a jusante do T7 humano no hu-emAb-Medi8852-AAV é a SEQ ID Nº: 125

FIG. 25F (continuação)

>Sequência de codificação da cadeia leve do Medi8852 no hu-emAb-Medi8852-AAV
GATATTAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCAGTGGGGATCGAGTGACCATTACCTGCCGAACCAGCCAGAGCCTGAGCT
CCTACACGCACTGGTATCAGCAGAACGCCGGCAAAGCCCCTAACGCTGCTGATCTACGCCGCTTAGTCGGGGTCCGGAGTGCCAAGCC
GGTTCTCCGGATCTGGGAGTGGAACCGACTTACCCCTGACAATTCAAGCCTGCAGCCCGAGGATTGCTACATACTACTGTCAGCAGAG
CAGAACTTCGGGCAGGGCACTAACGGTGGAGATCAAACGGACTGTGGCCGCTCTAGCGTGTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTG
AAGTCTGGCACTGCCCTGTGCGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCTGAGAGGCCAACGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGA
GCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACCTACAGCCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGAGCAAGGCCGACT
ACGAGAACGACAAGGTGTACGCCCTGCGAACGTGACACACCAGGGACTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAATGGGGCGAGTGC (SEQ
ID Nº: 283)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve do Medi8852 sem peptídeo de sinal no hu-emAb-Medi8852-AAV
DIQMTQSPSSLASVGDRVTICRTSQLSSYTHWYQQKPGKAPKLLIYAASSRGSGVPSRFSGSQTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSRTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEV
HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID Nº: 288)

78/110

FIG. 25G

hu-emAb-AMM01-AAV (2.555 bp)

TGTGACGCCCGGAGACAGAAGGTCTCTGGGTGGCTGGGTTTGTGGGTGAGGATGGACATTCTGCCATTGTGATTACTACTACTACATGGACGTCTGGG
Homologia a Montante do T7 Humano

20 40 60 80 100

GCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAACATGGCCACTCTAGGGCCTTGTCTGCCTGTGGGTTCCTGAGGGCATGTTCCGAGGGGACC
Homologia a Montante do T7 Humano

120 140 160 180 200

TGGGCGGACTGGCCAGGAGGGATGGGCACTGGGTGCCTTGAGGATCTGGAGCCTCTGGATTTCCATGCCTTGAAAATGGACTCAGGTTGGTGCGTC
Homologia a Montante do T7 Humano

220 240 260 280 300 320

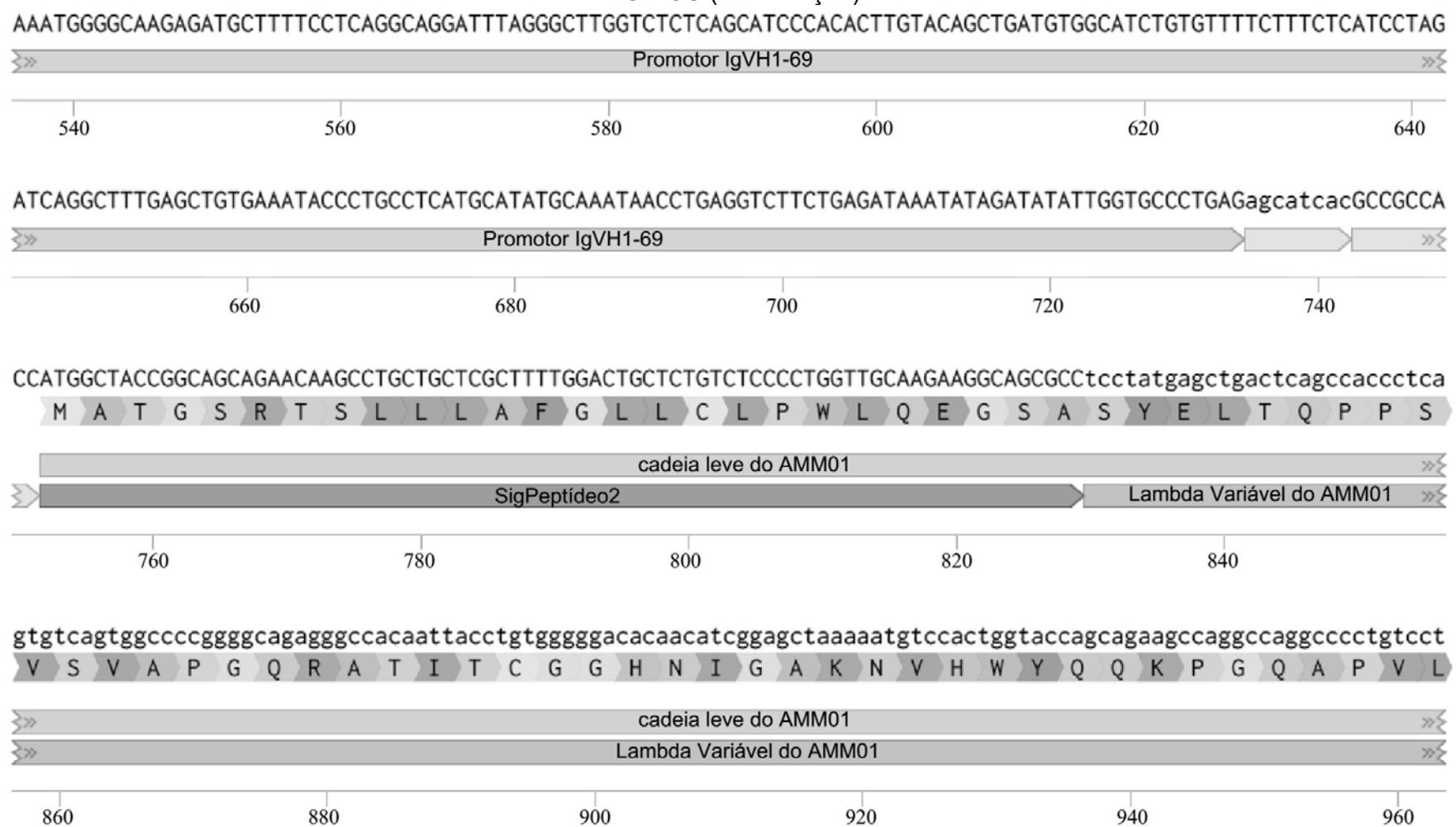
TGATGGAGTAACTGAGCCTGGGGCTTGGGAGCCACATTTGGACGAGATGCCTGAACAAACCAGGGTCTTAGTGATGGCTGAGGAATGTGTCTCAGGAGCGGTGT
Homologia a Montante do T7 Humano

340 360 380 400 420

CTGATCGTAATCTTAGGCCATAAAATGTGGTTCACAGTGAGGAGTGCATCCTGGGTTGGGTTCTGCAGCGGAAGAGCGCTGTGACAGAAAGCTTAG
Promotor IgVH1-69

440 460 480 500 520

FIG. 25G (continuação)



80/110

FIG. 25G (continuação)

ggtcatccaatatgatagcgaccggccctcagggatccctgagcgattctctggctccaactctggagcacggccaccctgaccatcagcagggtcgaagccgggg
V I Q Y D S D R P S G I P E R F S G S N S G S T A T L T I S R V E A G

cadeia leve do AMM01
Lambda Variável do AMM01

980 1.000 1.020 1.040 1.060

atgaggccgactattactgtcaggtgtggatagtggcgtggcatccccttatgtctcgaggtggaccaaggtcaccgtcttaggtcagcccaaggccaac
D E A D Y Y C Q V W D S G R G H P L Y V F G G G T K V T V L G Q P K A N

cadeia leve do AMM01
Lambda Variável do AMM01

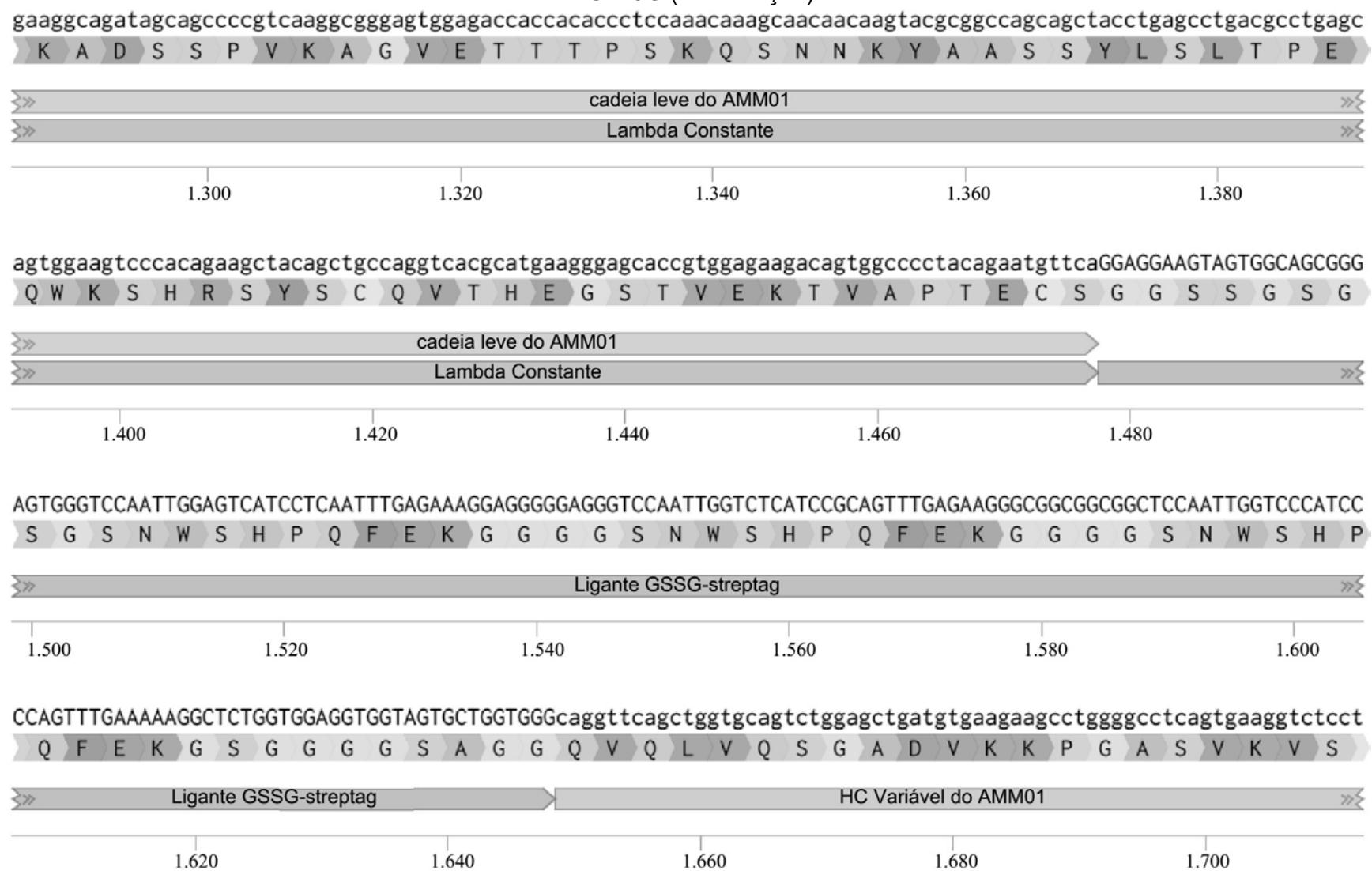
1.080 1.100 1.120 1.140 1.160

cccaactgtcactctgttcccaccctcgagtgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtctcataagtgacttctacccggagccgtgacagtggcctg
P T V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W

cadeia leve do AMM01
Lambda Constante

1.180 1.200 1.220 1.240 1.260 1.280

FIG. 25G (continuação)



82/110

FIG. 25G (continuação)

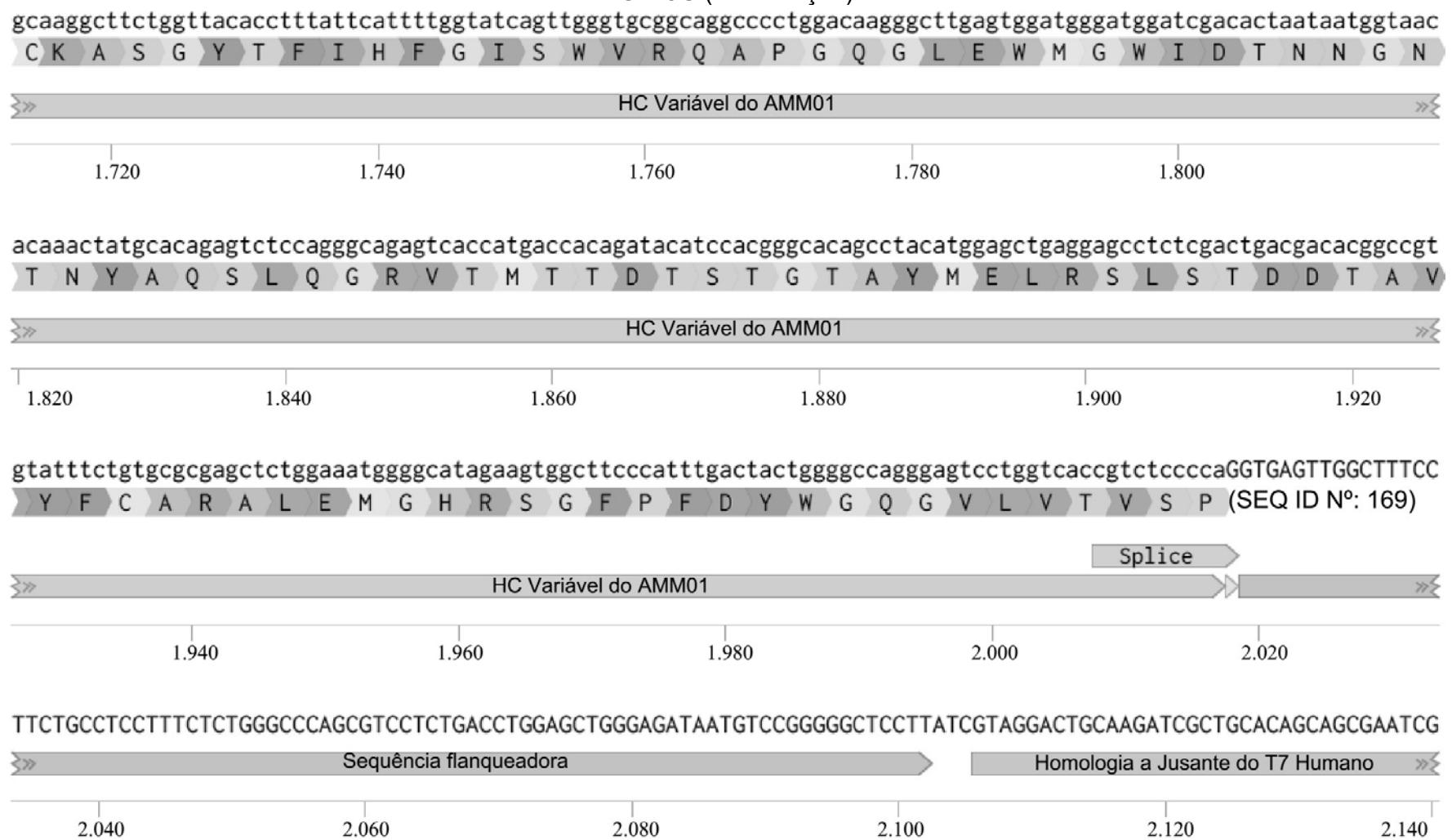


FIG. 25G (continuação)

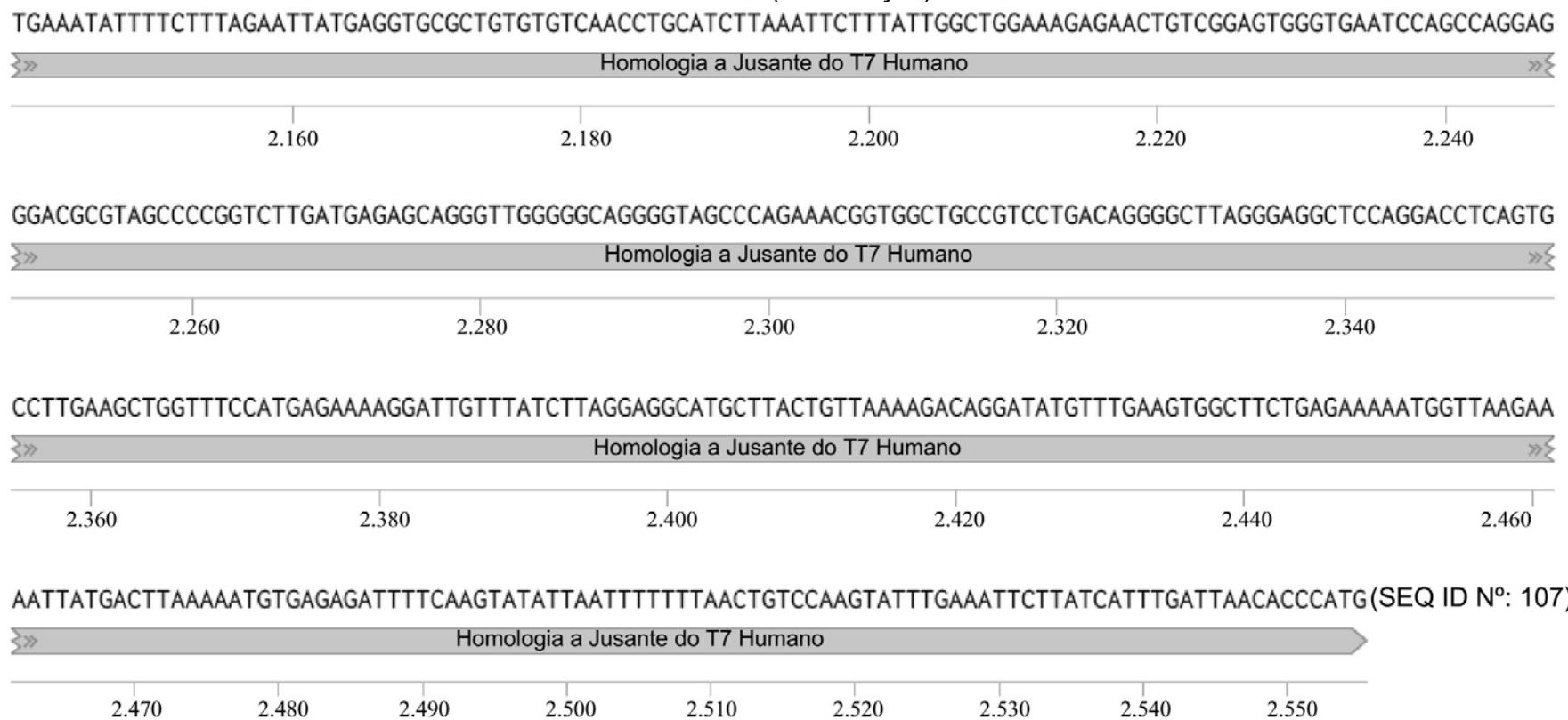


FIG. 25G (continuação)

>A região de homologia a montante do T7 humano no hu-emAb-AMM01-AAV é a SEQ ID Nº: 153

>O promotor IgVH1-69 no hu-emAb-AMM01-AAV é a SEQ ID Nº: 111

>A sequência de codificação do peptídeo de sinal no hu-emAb-AMM01-AAV é a SEQ ID N°: 112

>Sequência de codificação da cadeia leve do AMM01 no hu-emAb-AMM01-AAV

ATGGCTACCGGCAGCAGAACAGCCTGCTGCTCGCTTGGACTGCTCTGTCTCCCCCTGGTTGCAAGAAGGCAGCGCCTCCTATGAGCTGA
CTCAGGCCACCCCTCAGTGTCACTGGCCCCGGGCAGAGGGCCACAATTACCTGTGGGGACACAACATCGGAGCTAAAATGTCCACTGGT
ACCAAGCAGAACGCCAGGCCAGGCCCTGTCCTGGTCATCCAATATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCA
ACTCTGGGAGCACGCCACCCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGGCCGGGATGAGGCCACTATTACTGTCAAGGTGTTGGGATAGTGGTCGTG
GGCATCCCCTTATGTCTTCGGAGGTGGGACCAAGGTACCGTCCTAGGTCAAGGCCAAGGCCAACCCACTGTCACTCTGTTCCCACCCCTC
GAGTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAAGTGACTTCAACCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGA
TAGCAGCCCCGTCAAGGCAGGGAGTGGAGACCACACCCCTCAAACAAAGCAACAAGTACGCAGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGAC
GCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAACAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCCTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATG
TTCA (SEQ ID N°: 161)

>Sequência de codificação da cadeia leve variável lambda do AMM01 no hu-emAb-AMM01-AAV

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCCTCAGTGTCACTGGCCCCGGGGCAGAGGGCCACAATTACCTGTGGGGGACACAACATCGGAGCTAAA
AATGTCACACTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGCCAGGCCCTGTCCTGGTCATCCAATATGATAGCGACCGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGA
TTCTGGCTCCAACCTGGGAGCACGCCACCCCTGACCATCAGCAGGGTGAAGCCGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGG
GATAGTGGTCGTGGCATCCCCTTATGTCCTCGGAGGTGGGACCAAGGTCAACCGTCTAGGTCAGCCCCAAGGCCAACCCCCACTGTCACTC
TGTTCCCACCC (SEQ ID N°: 162)

>Sequência de codificação da cadeia leve constante lambda no hu-emAb-AMM01-AAV

TCGAGTGAGGAGCTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCA
GATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCTCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTG
ACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAA
TGTTCA (SEQ ID N°: 163)

>A sequência de codificação do ligante GSSG-streptag no hu-emAb-AMM01-AAV é a SEQ ID Nº: 116

FIG. 25G (continuação)

>Sequência de codificação da cadeia pesava variável do AMM01 no hu-emAb-AMM01-AAV
 CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGATGTGAAGAACGCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGTTACACCTTATTCTTTGGTATCAGTTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATGGACTAATAATGGTAACACAAACTATGCACAGAGTCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATAACATCCACGGGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTCTGACTGACGACACGGCCGTGTATTCTGTGCGCGAGCTCTGGAAATGGGCATAGAAGTGGCTCCATTGACTACTGGGCCAGGGAGTCCTGGTACCGCTCCCCA (SEQ ID Nº: 164)

>A sequência de aminoácidos do peptídeo de sinal no hu-emAb-AMM01-AAV é a SEQ ID Nº: 118

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve do AMM01 no hu-emAb-AMM01-AAV
 MATGSRTSLLAFLCLPWLQEGSASYELTQPPSVAVPGQRATITCGGHNIGAKNVHWYQQKPGQAPVLVIQYDSDRPSGIPERFSGSNSGSTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSGRATLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID Nº: 165)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve variável do AMM01 no hu-emAb-AMM01-AAV

SYELTQPPSVAVPGQRATITCGGHNIGAKNVHWYQQKPGQAPVLVIQYDSDRPSGIPERFSGSNSGSTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSGRGHPLYVFGGGTKVTVLGQPKANPTVTLFPP (SEQ ID Nº: 166)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve constante lambda do AMM01 no hu-emAb-AMM01-AAV

SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID Nº: 167)

>A sequência de aminoácidos do ligante GSSG-streptag no hu-emAb-AMM01-AAV é a SEQ ID Nº: 122

>Sequência de aminoácidos da cadeia pesada variável do AMM01 no hu-emAb-AMM01-AAV

QVQLVQSGADVKKPGASVKVSKASGYTFIHFGISWVRQAPGQGLEWMGWIDTNNGNTNYAQSLQGRVTMTDTSTGTAYMELRSLSTDATAYFCARALEMGHRSGFPFDYWGQGVLTSP (SEQ ID Nº: 168)

>A junção de *splice* com sequência flankeadora no hu-emAb-AMM01-AAV é a SEQ ID Nº: 151

>A homologia a jusante do T7 humano no hu-emAb-AMM01-AAV é a SEQ ID Nº: 125

FIG. 25G (continuação)

>Sequência de codificação da cadeia leve do AMM01 sem sequência de sinal no hu-emAb-AMM01-AAV
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCCTCAGTGTCACTGGCCCCGGGGCAGAGGGCCACAATTACCTGTGGGGACACAACATCGGAGCTAAA
AATGTCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTCCTGGTCATCCAATATGATAGCGACCAGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGA
TTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAGCACGGCCACCCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAAGGTGTGG
GATAGTGGTCGTGGGCATCCCCTTATGTCTCGGAGGTGGACCAAGGTCAACCGTCCTAGGTCAAGCCAAAGGCCAACCCCCTGTCACTC
TGTTCCCACCCCTCGAGTGAGGAGCTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC
CTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCAGGAGTGGAGACCACACCCTCCAACAAAGCAACAACAAGTACGCCAGCAGCTA
CCTGAGCCTGACGCCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGG
CCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID Nº: 284)

>Sequência de aminoácidos da cadeia leve do AMM01 sem peptídeo de sinal no hu-emAb-AMM01-AAV
SYELTQPPSVVAPGQRATITCGGNIGAKNVHWYQQKPGQAPVLVIQYDSDRPSGIPERFSGNSGSTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSGR
GHPLYVFGGGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW
KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID Nº: 289)

87/110

FIG. 25H

mRSV-Integração de Splice de Balb/C (2.261 bp)

CTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAAGAATGGCCTCTCCAGGTCTTATTAAACCTTGTTATGGAGTTCTGAGCATTGCAGACTAA

20 40 60 80 100

TCTTGGATATTGTCCTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAAGTTGGAAATAACTGTCTAGGGATCTCAGAGCCTTAGGACAGATTATCTCACATCTTGAAAAACT

120 140 160 180 200

AAGAACATCTGTGTGATGGTGGTGGAGTCCTGGATGATGGATAGGGACTTGGAGGCTCATTTGAAGAAGATGCTAAAACAATCCTATGGCTGGAGGGATAGTT

220 240 260 280 300 320

GGGGCTGTAGTTGGAGATTTCAGTTAGAATAAAAGTATTAGTTGGAATATACTTCAGGACCACCTGTGACAGCATTATACAGTATCCGATGGACAAGT

Genômica Flanqueadora ➤ ➞

340 360 380 400 420

GAGTGTCTCAGGTTAGGATTCTATTAAAGATTGAGATATTAGGCTTGATACTACATCTAAATGGTCTGTACATGTCTCGAAGAAAGTTCTCAGACAGAGTTAGG

»» ➞

440 460 480 500 520

ACTTGGATCCAGGAGTTAGGACTTGGACTCAGGAGGACTCTAGTTCTTCTCCAGCTGGATGCTCTATGTAAGAAAAGCCTGCCTCATGAGTATGCA

»» Promotor J558H10 ➞

540 560 580 600 620 640

FIG. 25H (continuação)

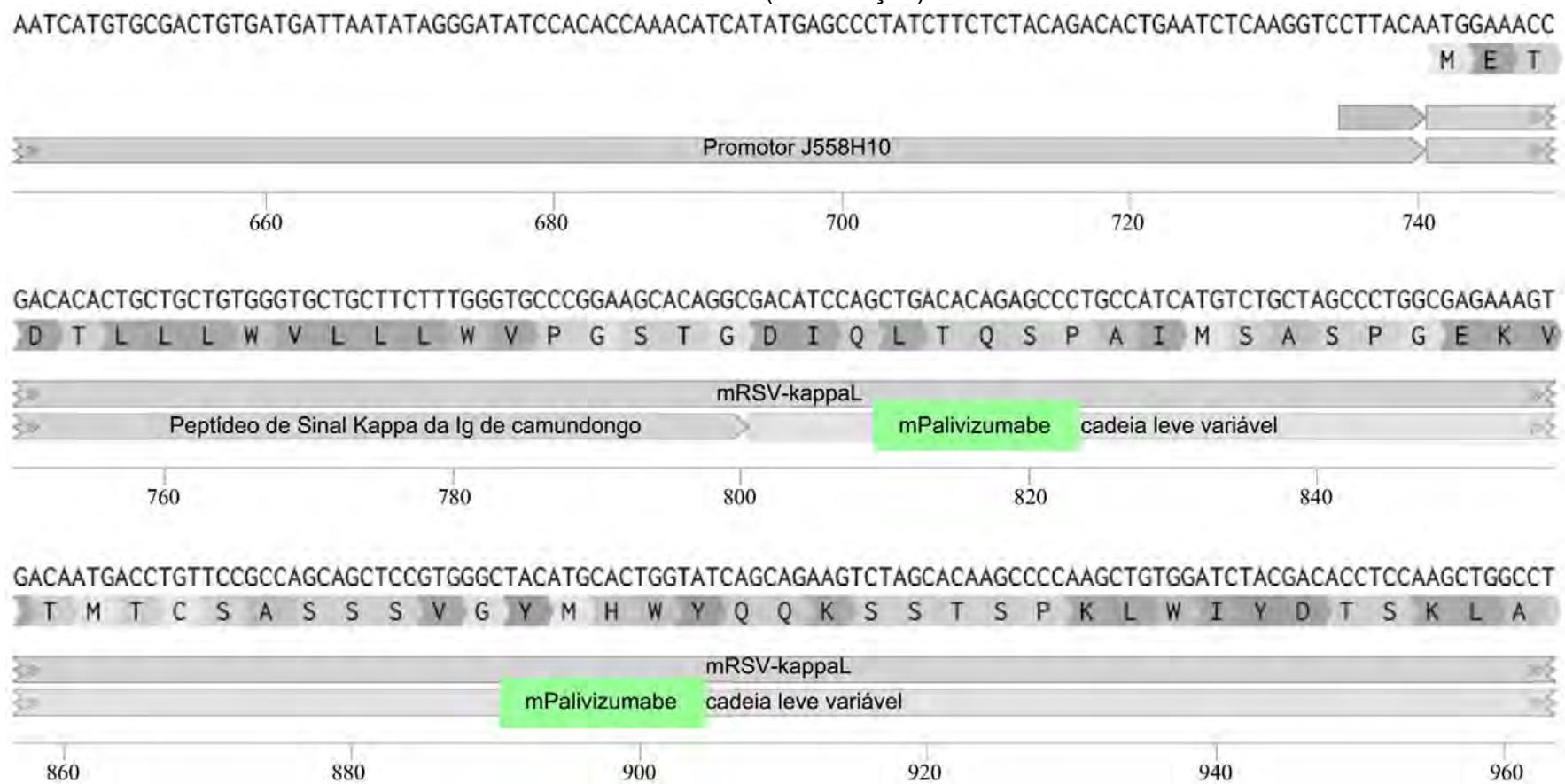


FIG. 25H (continuação)

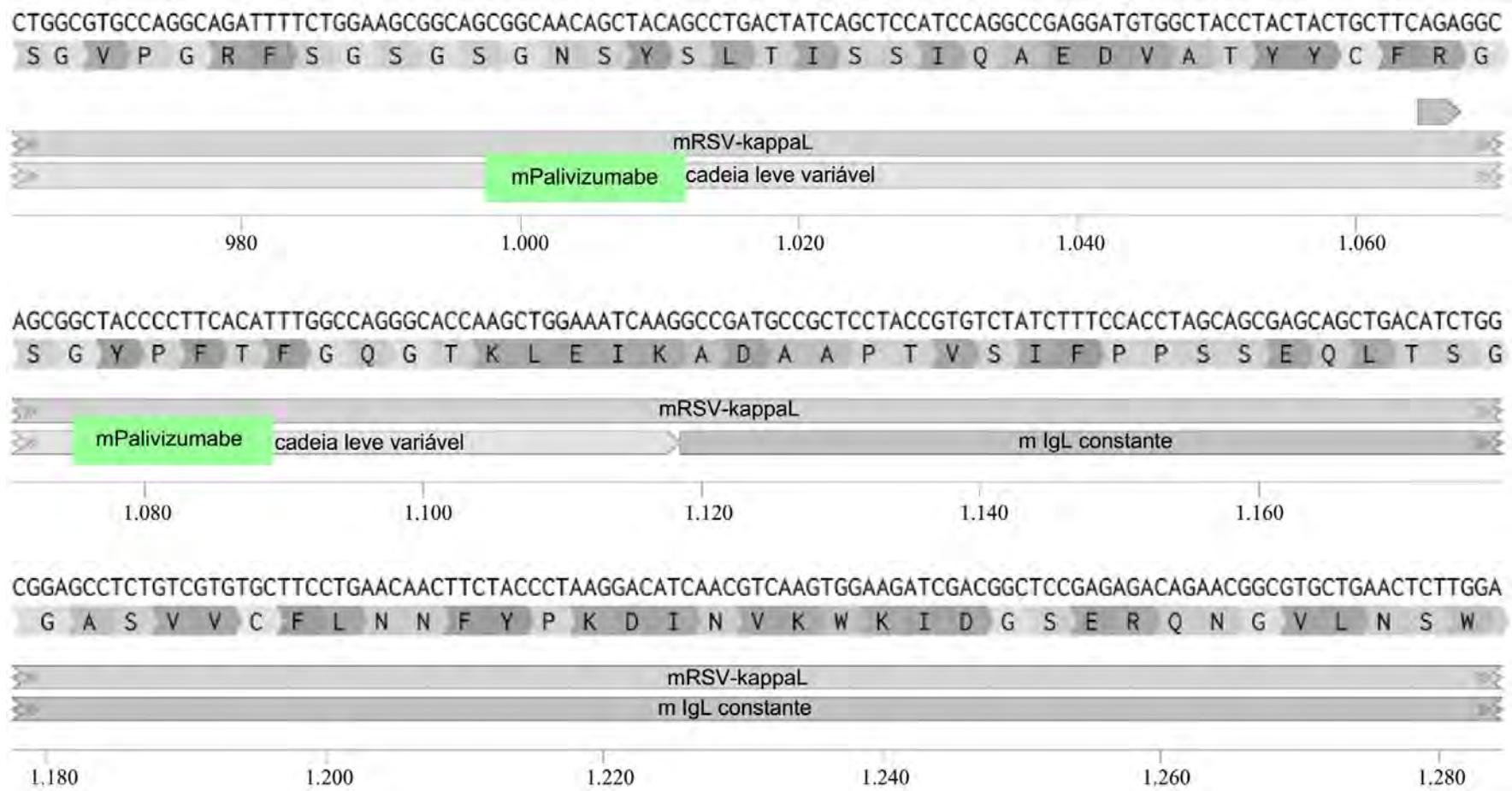
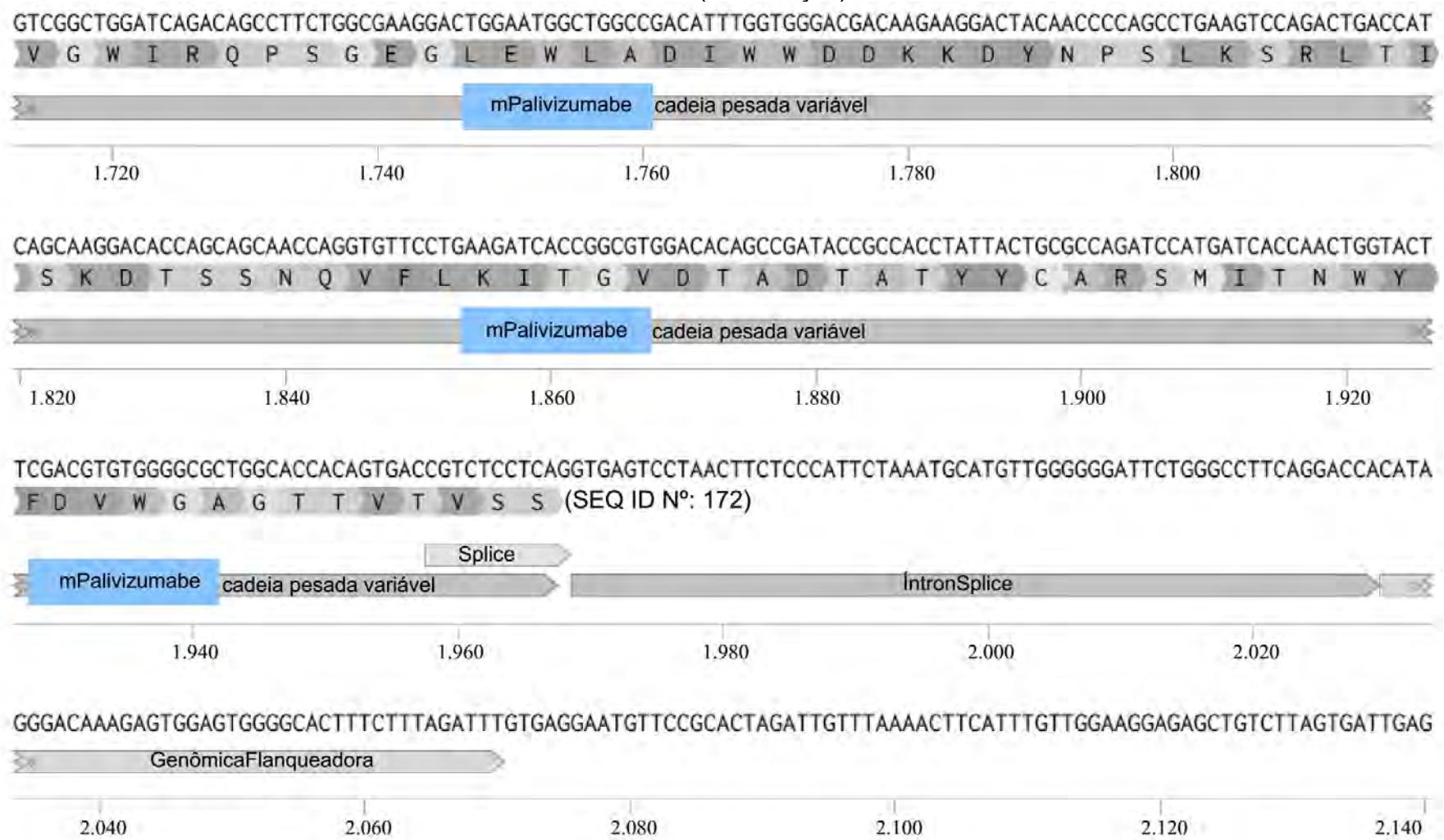


FIG. 25H (continuação)



FIG. 25H (continuação)



92/110

FIG. 25H (continuação)

TCAAGGGAGAAAGGCATCTAGCCTCGGTCTAAAAGGGTAGTTGCTGTCTAGAGAGGTCTGGTGGAGCCTGCAAAGTCCAGCTTCAAAGGAACACAGAAGTATGT

2.160

2.180

2.200

2.220

2.240

GTATGGAATATTAG (SEQ ID NO: 108)

2.250

2.260

FIG. 25H (continuação)

>DNA genômico flankeador a montante no mRSV-Integração de Splice de Balb/C
AGGACCACCTCTGTGACAGCATTATACAGTATCCGATG (SEQ ID Nº: 170)

>O promotor J558H10 no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 128

>A sequência de codificação do peptídeo de sinal no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 129

>A sequência de codificação da cadeia leve do mPalivizumabe no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 130

>A sequência de codificação da cadeia leve variável do mPalivizumabe no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 131

>A sequência de codificação da cadeia leve constante kappa do mPalivizumabe no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 132

>A sequência de codificação do ligante GSSG-streptag no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 116

>A sequência de codificação da cadeia pesava variável do mPalivizumabe no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 133

>A sequência de aminoácidos do peptídeo de sinal no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 134

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve do mPalivizumabe no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 135

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve variável do mPalivizumabe no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 136

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve constante kappa do mPalivizumabe no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 137

>A sequência de aminoácidos do ligante GSSG-streptag no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 122

>A sequência de aminoácidos da cadeia pesada variável do mPalivizumabe no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 138

>A junção de *splice* com sequência flankeadora no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 139

>DNA genômico flankeador a jusante no mRSV-Integração de Splice de Balb/C
CATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTCTTAGATT (SEQ ID Nº: 171)

>A sequência de codificação da cadeia leve do mPalivizumabe sem sequência de sinal no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 281

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve do mPalivizumabe sem peptídeo de sinal no mRSV-Integração de Splice de Balb/C é a SEQ ID Nº: 286

94/110

FIG. 25I

TT-hRSV-T7-integrado (1.707 bp)

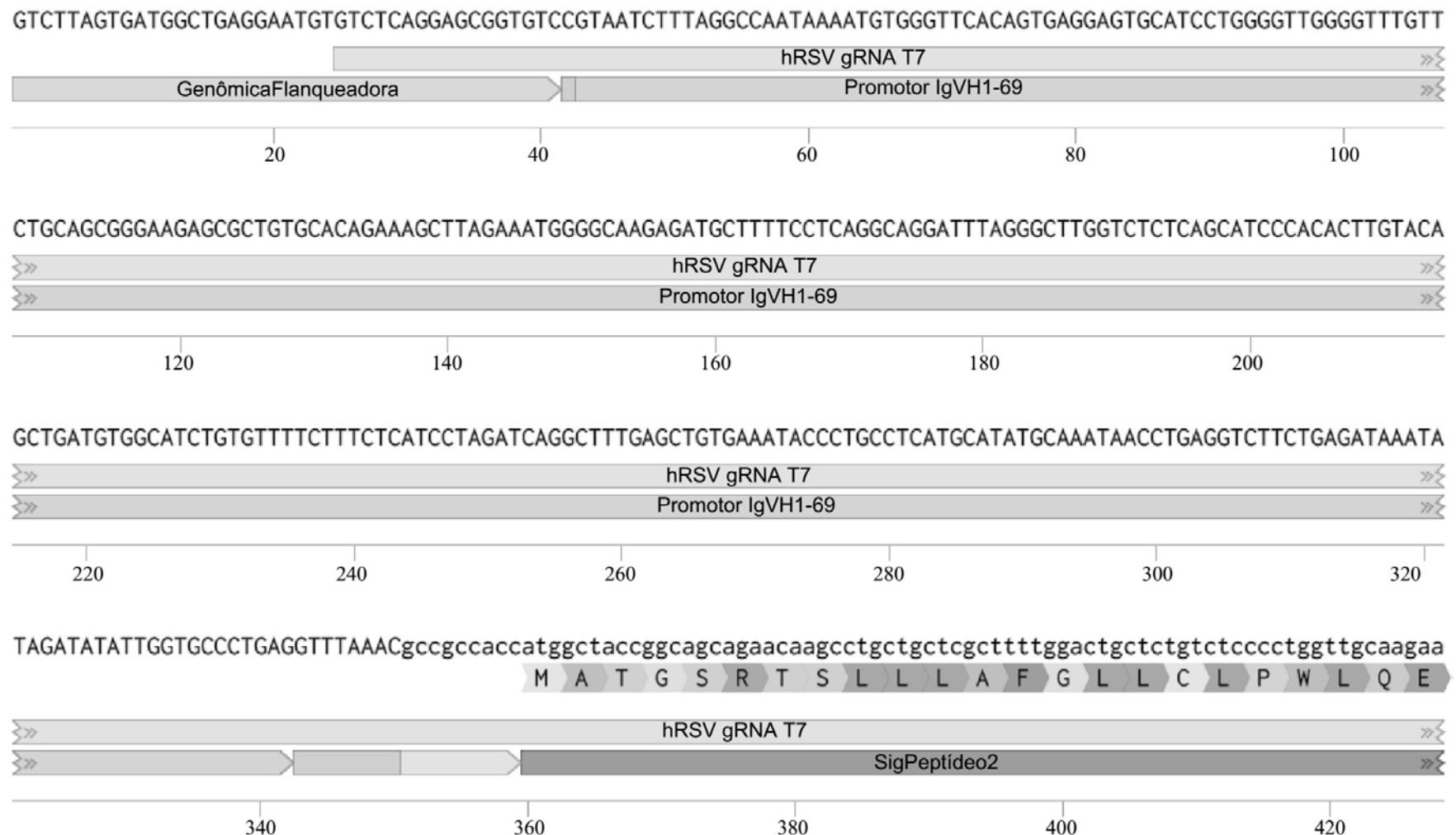


FIG. 25I (continuação)

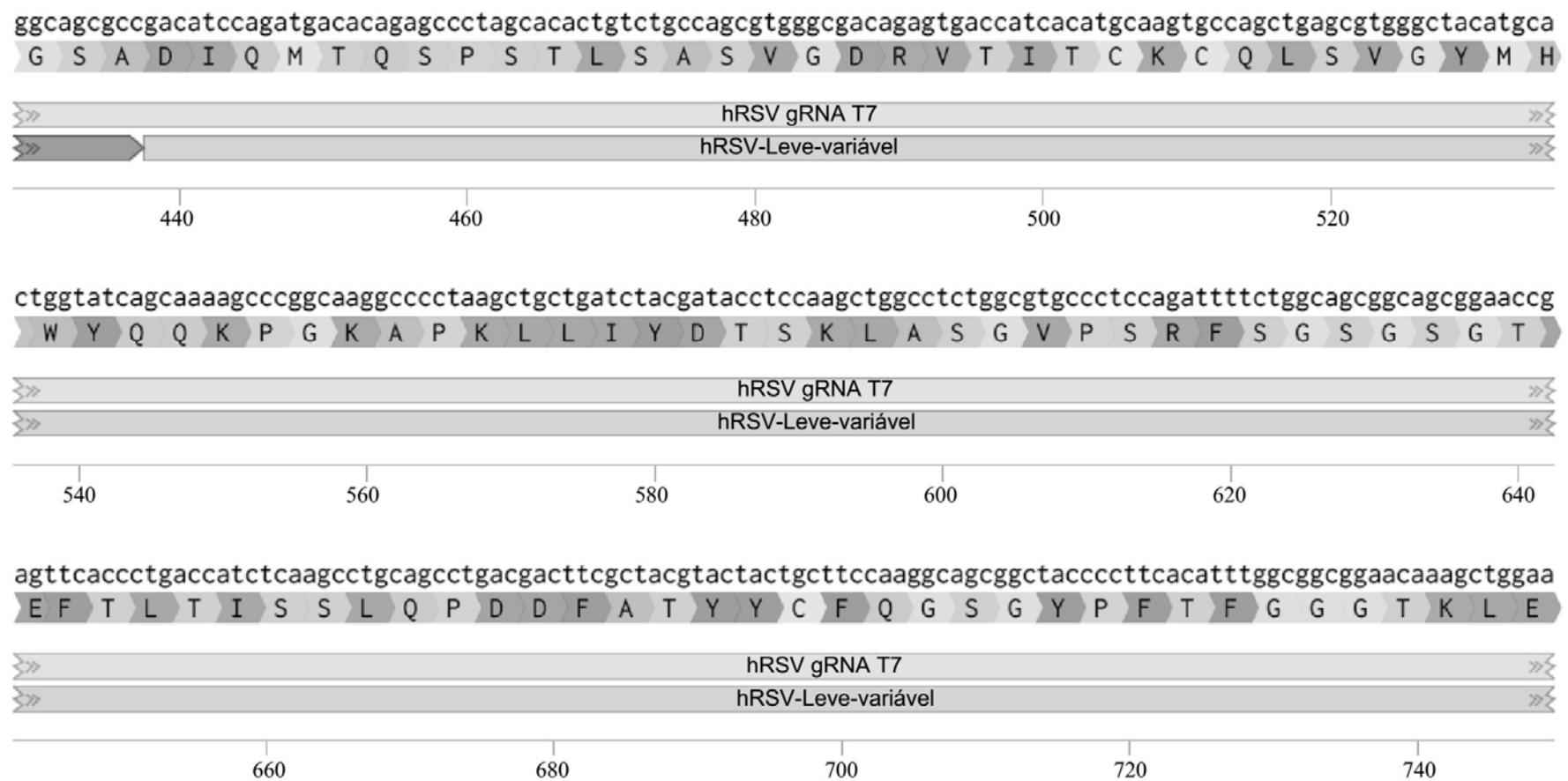
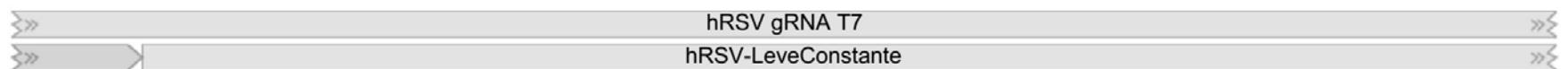


FIG. 25I (continuação)

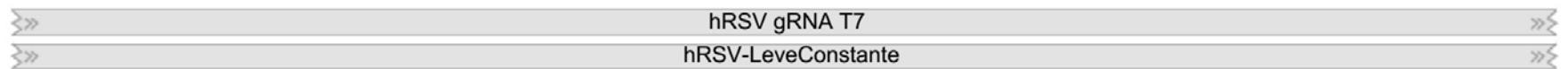
atcaagcgactgtggccgctcctagcgtagttcatttccacacctagcgcacgagcactgaagtctggactgcctctgtgcctgcgtgaacaacttctaccc
 I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P



hRSV gRNA T7
 hRSV-LeveConstante

760 780 800 820 840

tcgagaggccaagggtgcagtggaaagtggacaatgccctgcagagcggcaacagccaagagtctgtgaccgagcaggactccaaggattccacacctacagcctgtcta
 R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S



hRSV gRNA T7
 hRSV-LeveConstante

860 880 900 920 940 960

gcaccctgactctgagcaaggcccactacgagaaggcacaagggtgtacgcctgcgaagtgacacaccaggactgaggcagccctgtgaccaagagcttcaatcgcccc
 S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G



hRSV gRNA T7
 hRSV-LeveConstante

980 1.000 1.020 1.040 1.060

FIG. 25I (continuação)

gagtgcGGAGGAAGTAGTGGCAGCGGGAGTGGGTCCAATTGGAGTCATCCTCAATTGAGAAAGGAGGGGGAGGGTCCAATTGGTCTCATCCGAGTTGAGAAGGG
 E C G G S S G S G S N W S H P Q F E K G G G S N W S H P Q F E K G

»» hRSV gRNA T7 »»
 »» Ligante GSSG-streptag »»
 1.080 1.100 1.120 1.140 1.160

CGGCGGCGGCTCCAATTGGTCCCATCCCCAGTTGAAAAAGGCTCTGGTGGAGGTGGTAGTGCTGGTGGcaagtgaccctgagagagtctggacctgctctggtca
 G G G S N W S H P Q F E K G S G G G G S A G G Q V T L R E S G P A L V

»» hRSV gRNA T7 »»
 »» Ligante GSSG-streptag »» hRSV-PesadaVariável »»
 1.180 1.200 1.220 1.240 1.260 1.280

agcccacacagaccctgacactgacacctcacccttcagcggttagcctgagcacaagcgcatgagcgtcggctggattagacagcctcctggcaaagccctggaa
 K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G M S V G W I R Q P P G K A L E

»» hRSV gRNA T7 »»
 »» hRSV-PesadaVariável »»
 1.300 1.320 1.340 1.360 1.380

FIG. 25I (continuação)

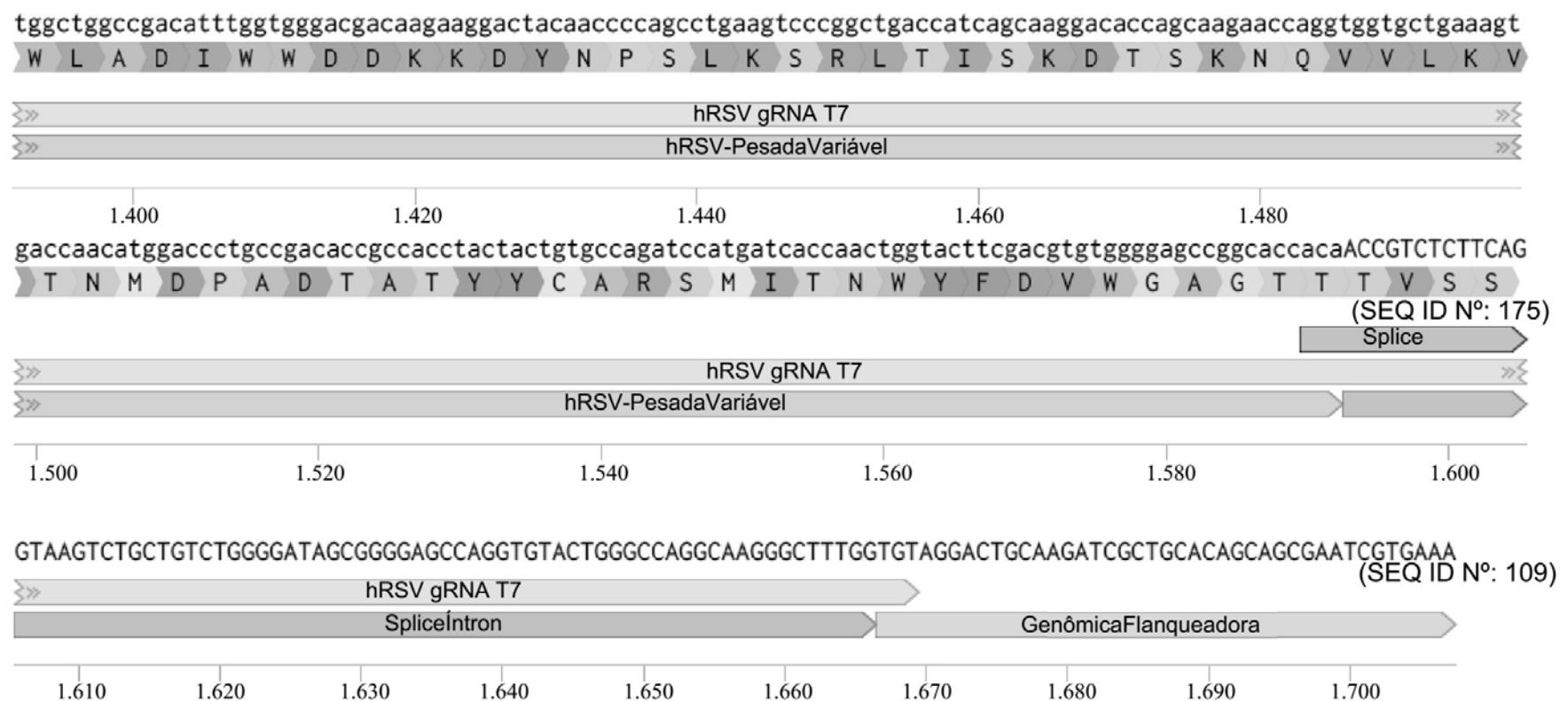


FIG. 25I (continuação)

>Sequência de DNA genômico flanqueadora a montante no TT-hRSV-T7-integrado

GTCTTAGTGATGGCTGAGGAATGTGTCAGGAGCGGTGTC (SEQ ID N°: 173)

>O promotor IgVH1-69 no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 111

>A sequência de codificação do peptídeo de sinal no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 112

>A sequência de codificação da cadeia leve do hRSV no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 113

>A sequência de codificação da cadeia leve variável do hRSV no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 114

>A sequência de codificação da cadeia leve constante kappa no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 115

>A sequência de codificação do ligante GSSG-streptag no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 116

>A sequência de codificação da cadeia pesava variável do hRSV no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 117

>A sequência de aminoácidos do peptídeo de sinal no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 118

>A sequência de aminoácidos da cadeia pesada do hRSV no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 119

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve variável do hRSV no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 120

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve constante kappa no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 121

>A sequência de aminoácidos do ligante GSSG-streptag no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 122

>A sequência de aminoácidos da cadeia pesava variável do hRSV no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 123

>A junção de *splice* com sequência flanqueadora no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 124

>Sequência de DNA genômico flanqueador a jusante no TT-hRSV-T7-integrado

TGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCGAATCGTGAAA (SEQ ID N°: 174)

FIG. 25I (continuação)

>A sequência de codificação da cadeia leve do hRSV sem sequência de sinal no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 280

>A sequência de aminoácidos da cadeia leve do hRSV sem sequência de sinal no TT-hRSV-T7-integrado é a SEQ ID N°: 285

FIG. 26A

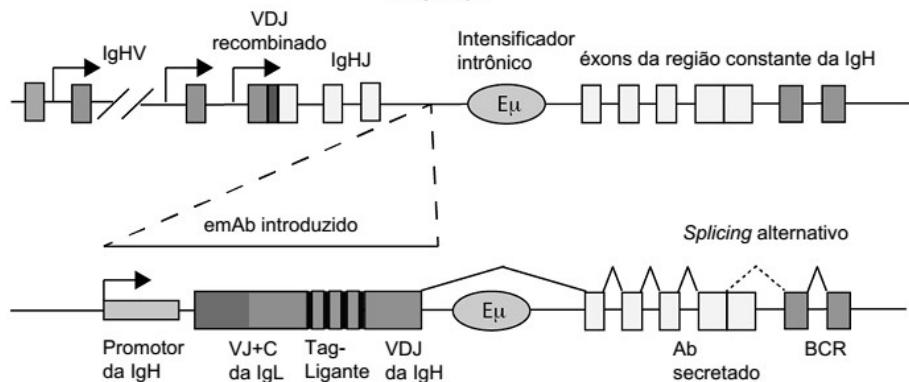


FIG. 26B

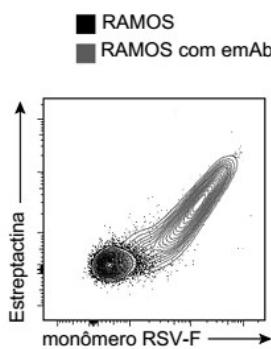


FIG. 26C

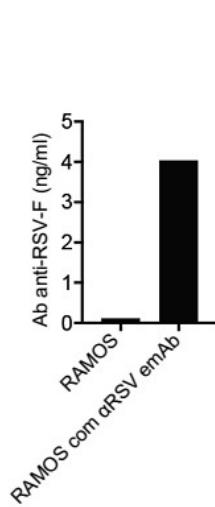


FIG. 26D

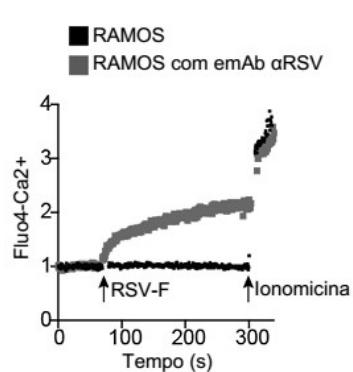


FIG. 27A

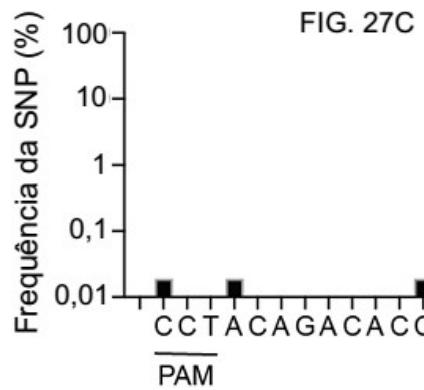
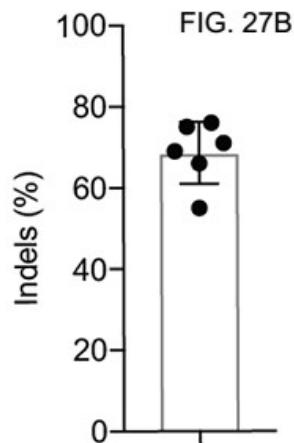
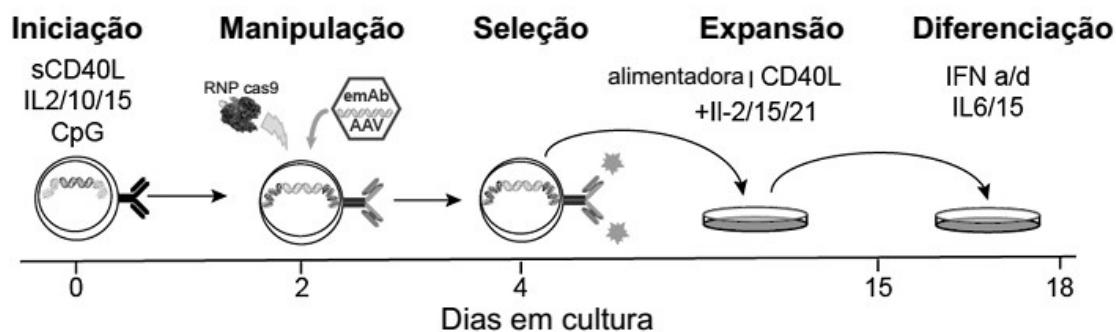


FIG. 27D

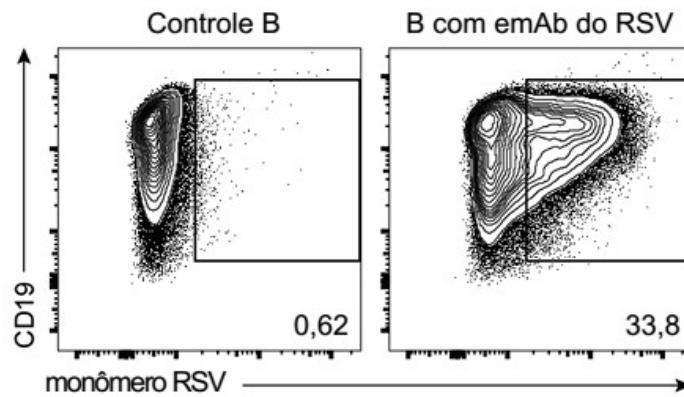


FIG. 27E

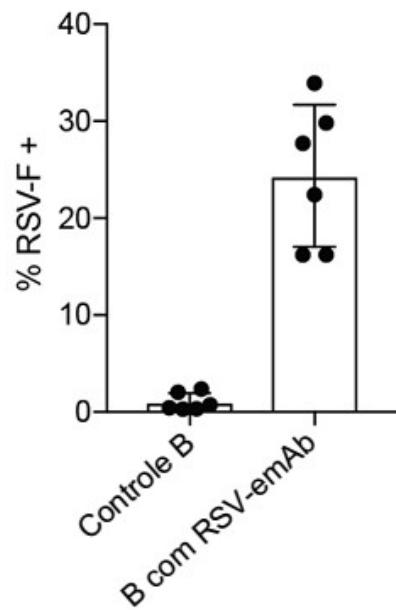


FIG. 27F

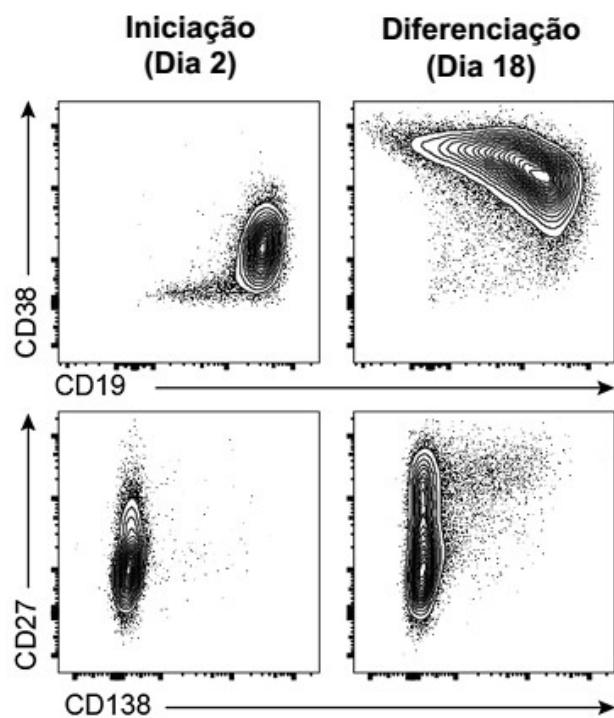


FIG. 27G

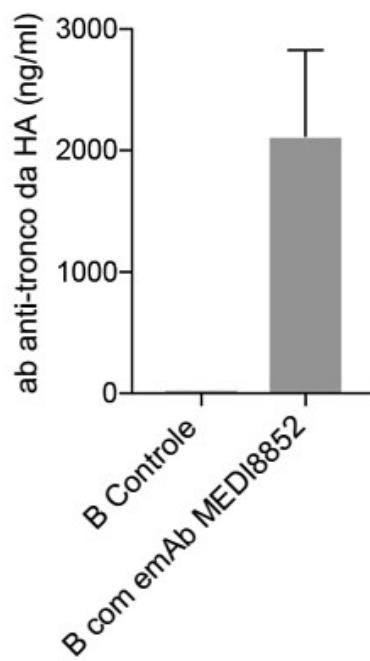


FIG. 28

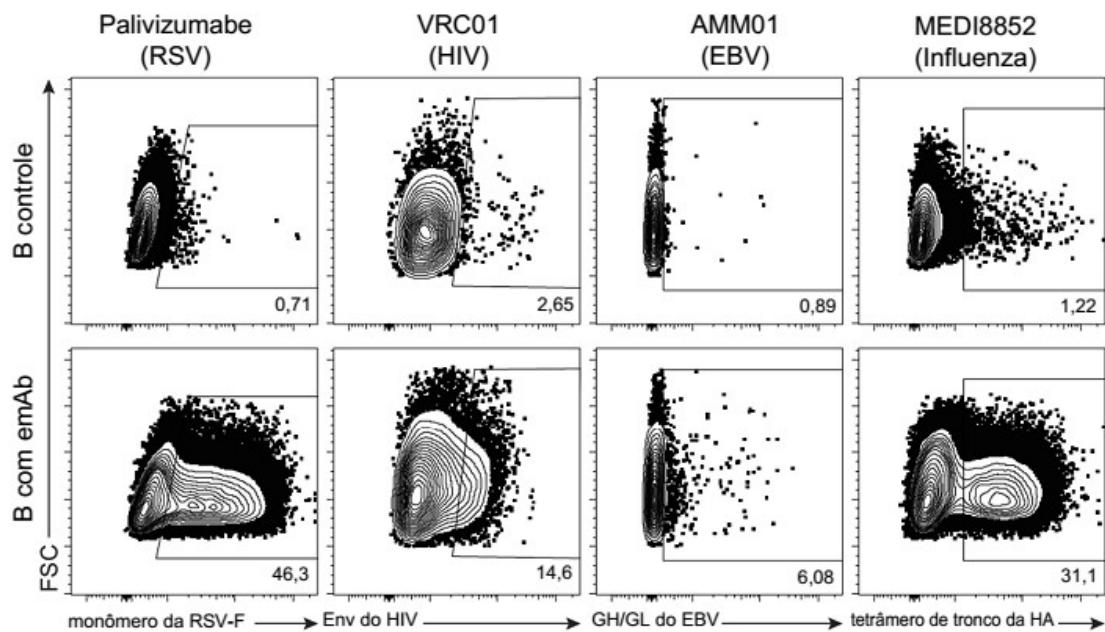


FIG. 29A

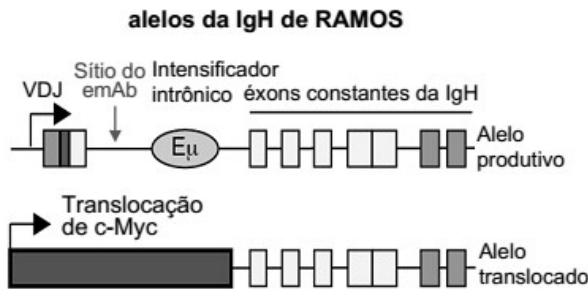


FIG. 29B

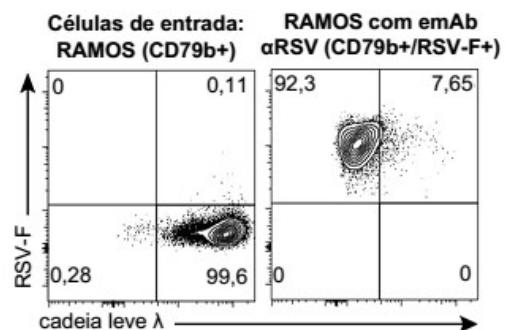


FIG. 29C

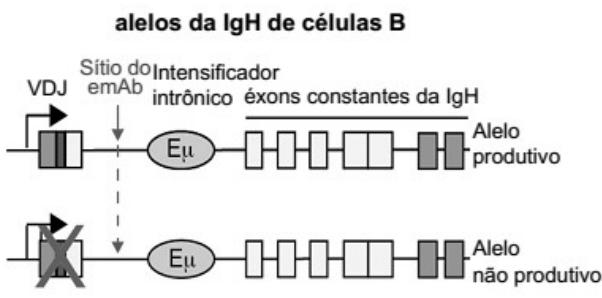


FIG. 29D

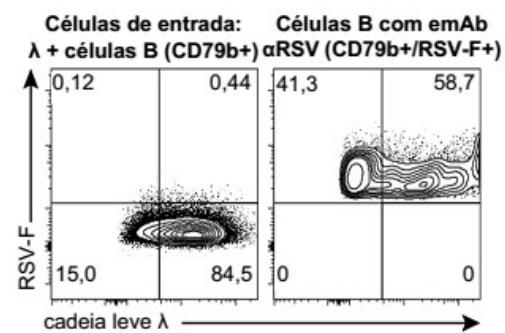


FIG. 30A

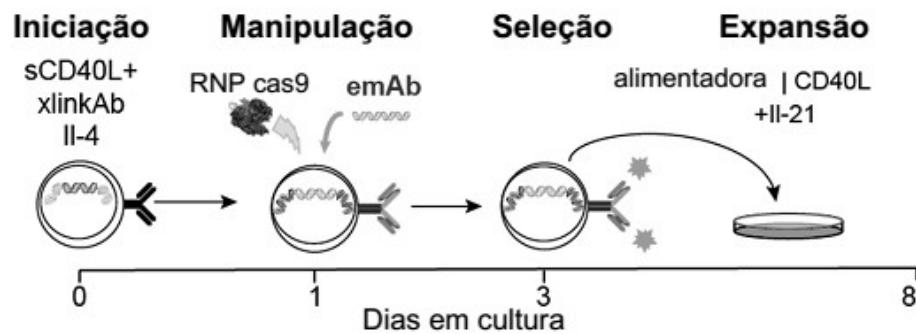


FIG. 30B

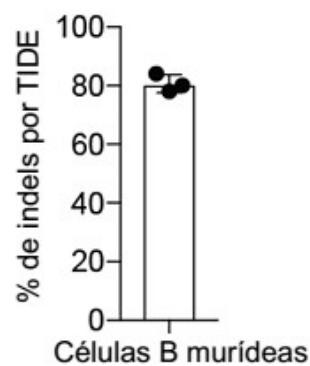


FIG. 30C

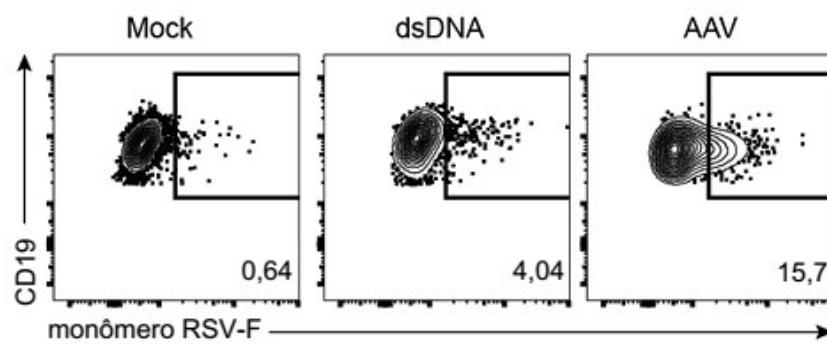


FIG. 30D

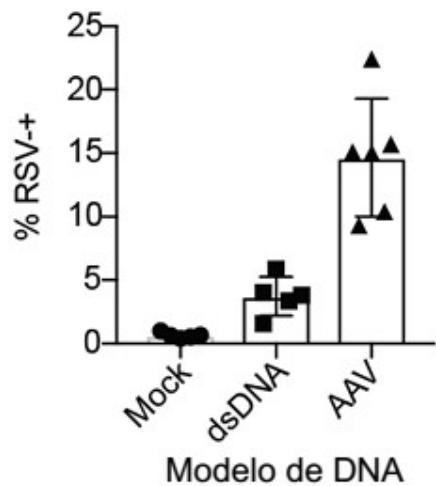


FIG. 30E

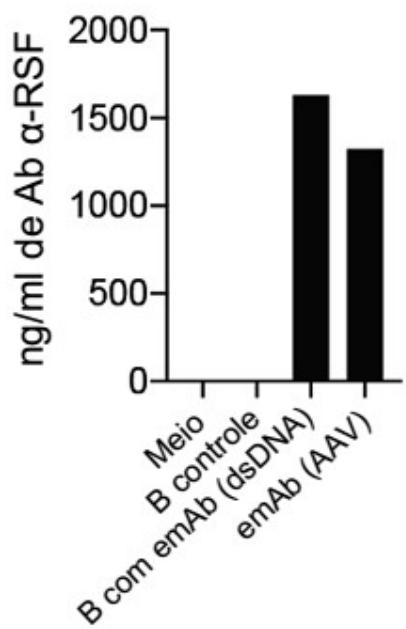


FIG. 31A

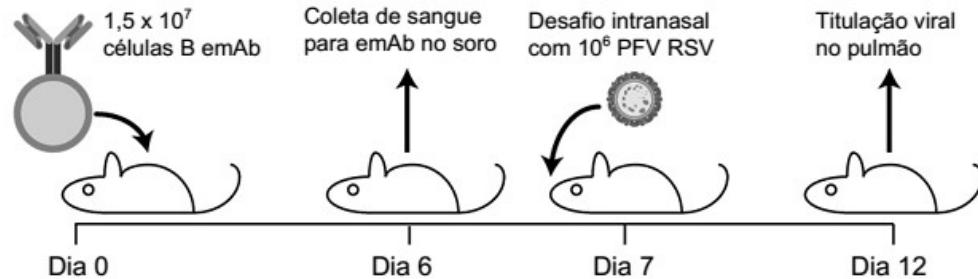


FIG. 31B

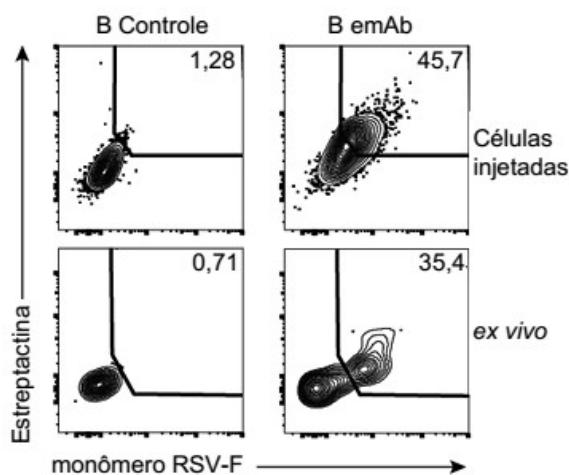


FIG. 31C

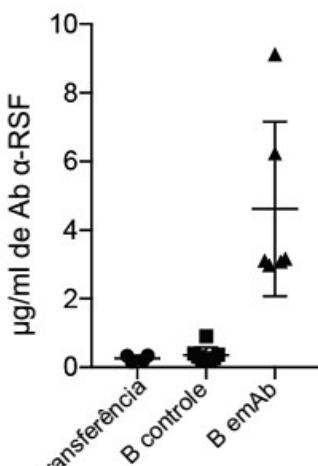


FIG. 31D

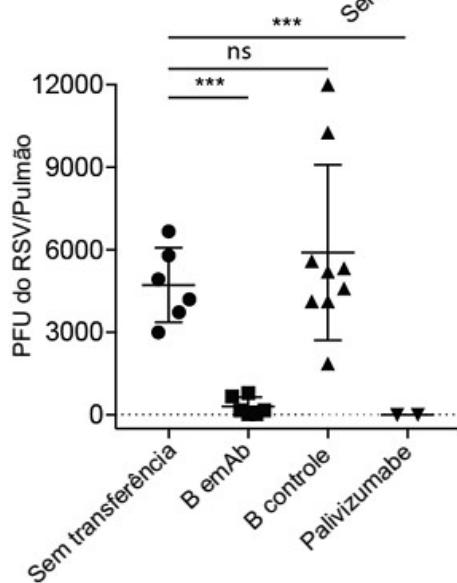


FIG. 32A

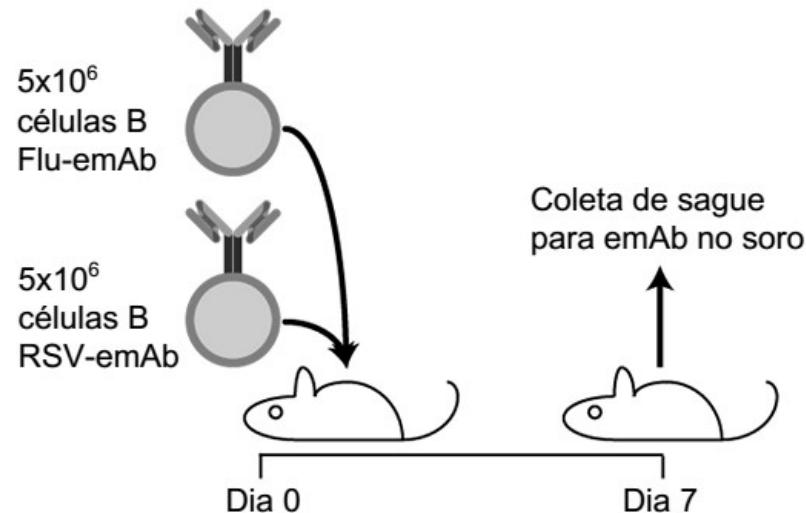


FIG. 32B

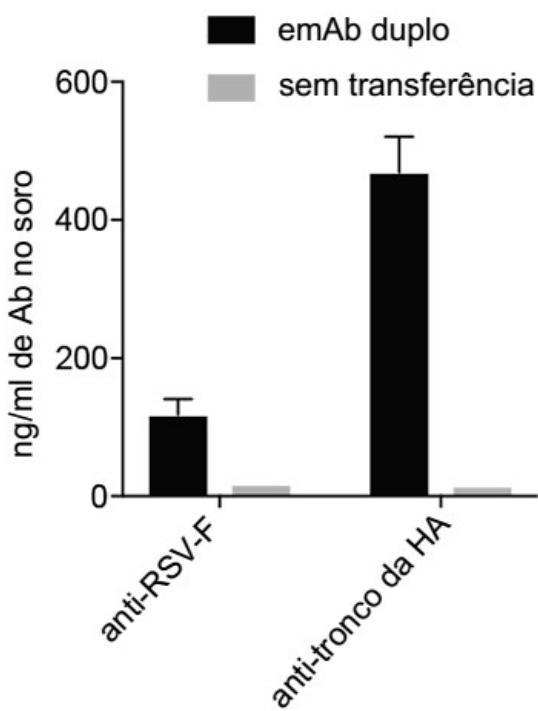


FIG. 33A

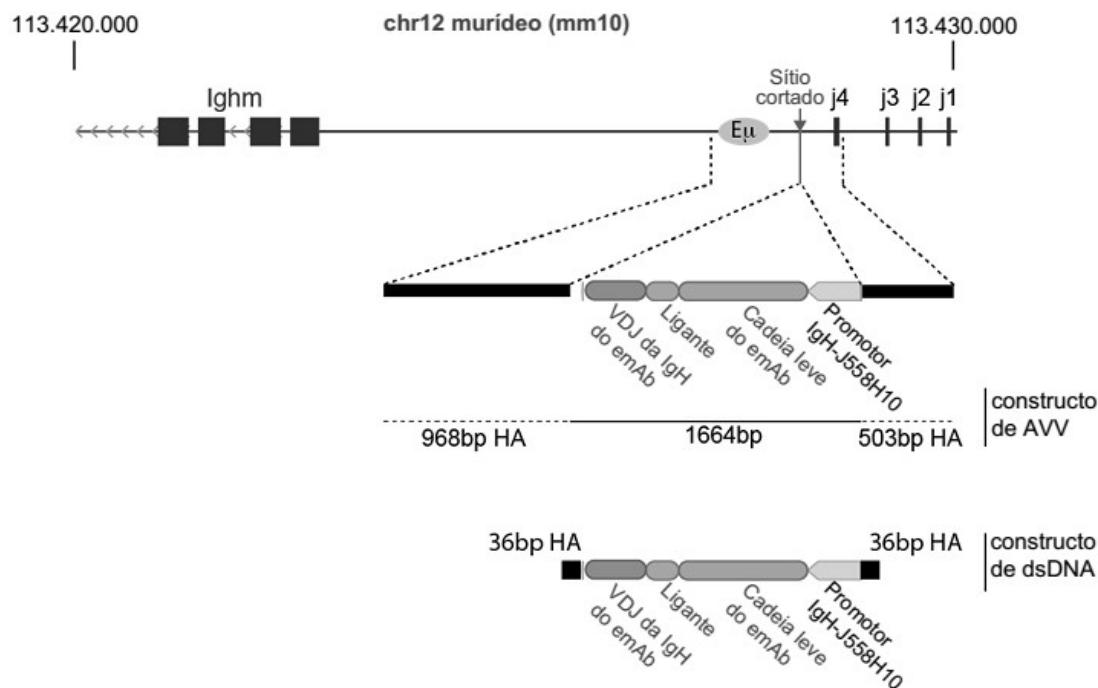
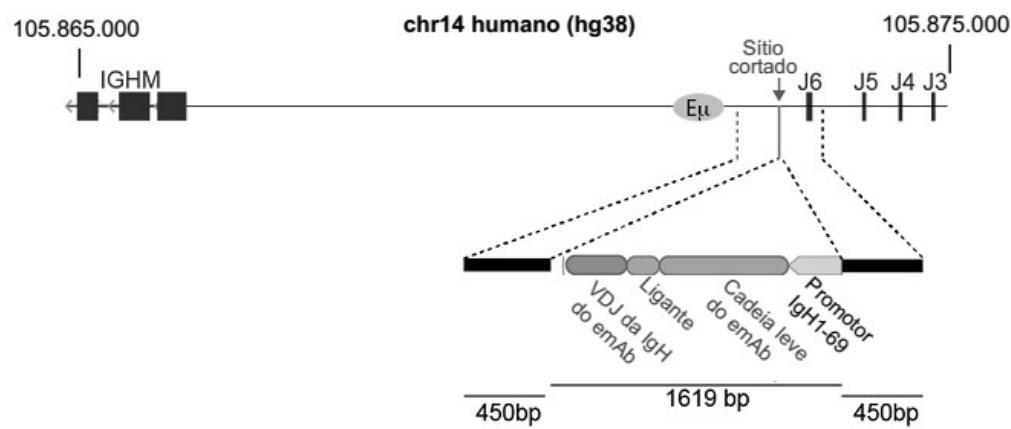


FIG. 33B



RESUMO

"SISTEMAS E MÉTODOS PARA PRODUZIR CÉLULAS B GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA EXPRESSAR ANTICORPOS SELECCIONADOS"

A presente invenção refere-se a sistemas e métodos para modificar geneticamente células B para que expressem anticorpos selecionados. Os sistemas e métodos podem ser usados para: eliminar a necessidade de vacinações clássicas; oferecer proteção contra agentes infecciosos contra os quais ainda não há vacinas disponíveis; oferecer proteção contra agentes infecciosos quando os pacientes tiverem a imunidade suprimida por algum outro motivo; e/ou prover um benefício oferecido por um anticorpo terapêutico, tal como no tratamento de transtornos autoimunes.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 201.648-6 - Listagem de Sequências.txt
- Data de Geração do Código: 20/04/2020
- Hora de Geração do Código: 11:48:51
- Código de Controle:
 - Campo 1: CA3A7DDA92B38FE7
 - Campo 2: F573F334BBFA30B3